



Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques : applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur réparation sur support.

Mélanie Flaender

► To cite this version:

Mélanie Flaender. Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques : applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur réparation sur support.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00558563

HAL Id: tel-00558563

<https://theses.hal.science/tel-00558563>

Submitted on 22 Jan 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Mélanie FLAENDER

le 29 octobre 2010

**NOUVELLES SONDES OLIGONUCLÉOTIDIQUES FLUORESCENTES OU
PARAMAGNÉTIQUES :
APPLICATIONS À L'ÉTUDE STRUCTURALE DES LÉSIONS DE L'ADN
ET À LEUR RÉPARATION SUR SUPPORT.**

Thèse dirigée par Alain FAVIER et codirigée par Didier GASPARUTTO

JURY

M. Franz BRUCKERT	Professeur INPG	Président
Mme Carole CHAIX	Directeur de recherche CNRS	Rapporteur
M. Jian-Sheng SUN	Professeur MNHM, DNA therapeutics	Rapporteur
M. François BERGER	Professeur Université de Grenoble	Examineur
M. Bertrand CASTAING	Directeur de recherche CNRS	Examineur
M. Didier GASPARUTTO	Directeur de recherche CEA	Examineur

Thèse préparée au sein du Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques
SCIB (UMR-E3 CEA/UJF, FRE3200 CNRS/CEA) / INAC
Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, centre de Grenoble
École Doctorale Chimie Sciences du Vivant

Remerciements

Je n'imaginai pas le nombre de personnes que j'allais rencontrer au cours de ma thèse et que cette page allait être autant remplie ! Finalement trois ans de thèse c'est beaucoup de rencontres, humaines et scientifiques.

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs, le Dr Carole Chaix et le Pr Jian-Sheng Sun, d'avoir accepté de juger mon travail. Mes remerciements vont également aux Pr François Berger, Pr Franz Bruckert, Pr Bertrand Castaing et Pr Alain Favier pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens ensuite à remercier énormément Didier Gasparutto. Tout d'abord pour m'avoir acceptée en thèse et m'avoir fait confiance même si je n'avais pas le profil idéal a priori. Notre rencontre fut orchestrée par un ami, Guillaume F, et sa sœur Sandra Reynaud qui travaille au LAN. Alors à tous les trois un grand merci pour tout ça ! Ces trois années n'ont pas toujours été faciles, d'autant que chaque manip remettait en cause ou presque la suite du projet. Merci Didier d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes interminables questions, m'avoir appris un peu de ta science de chimiste et m'avoir guidée durant tout ce temps.

De manière générale je remercie tous les Lanistes pour m'avoir accueillie et rendu mon séjour parmi vous si agréable ! A ce titre je remercie Thierry Douki, notre grand chef, pour m'avoir accueillie au LAN et avoir gardé sa porte ouverte lorsque j'avais des questions ! J'ai très vite pris le pli sur les petites habitudes fort plaisantes du labo ; deux règles d'or : les pauses café joviales et le départ pour la cantine à 11h30.

Dès la première semaine au labo j'ai fait connaissance avec l'HPLC qui m'a "accompagnée" tout au long de ces 3 années. Cela m'a valu le surnom de "Bingo Collector" par Stéphane que j'en profite pour remercier pour nos discussions de couloir en attendant que le Timer sonne ! Ces collectes de "pics" m'ont amené à débiter une longue, très longue, série de demandes de spectres MALDI-TOF auprès de Christine ! Ah, Kike, on en a passé des moments ensemble devant le MALDI, l'HPLC, la salle des gels... ça a été un vrai plaisir de passer ces trois ans à tes côtés ! On a beaucoup partagé, rigolé, parfois même salé nos échantillons... et ta présence a toujours été d'un énorme soutien ! Alors vraiment, un grand merci !

Une fois les oligos synthétisés, purifiés, caractérisés, il a fallu les spotter... toute une histoire !! C'est là que la team des "Guillaume du LETT" intervient. Un grand merci à tous les deux ! Sans vous j'ai bien conscience que le projet serait vite tombé à l'eau !! Ça va me manquer de ne plus faire des allers-retours en salle, de revêtir les habits de cosmonaute ! Guillaume C., vraiment, vraiment MERCI !

Et quand le robot ne marchait pas (si si ça arrive), je m'en remettais à Sylvain, qui m'a sauvé quelques séries de manip ! Tu m'as été d'une grande aide, à m'apprendre à me servir du lecteur,

à faire les extraits, les dosages... c'était très agréable de "manip" au labo Jaune et de papoter avec toi !

Le labo Jaune, d'ailleurs, parlons-en ! Toujours super animé, surtout de janvier à juillet ! Avec de la musique entraînante, souvent de la techno... sauf quand Serge en avait marre... une bonne ambiance de travail !! Alors merci à tous ses occupants !

Ma p'tite Anne, c'est là que tu m'as initié à la qPCR ! Bon ça n'a rien donné, mais tu as pris le temps de m'apprendre, et on a bien rigolé ! Je te remercie pour tout ça et pour les soirées endiablées passées en ta compagnie !! Bon courage pour cette année, mais tu vas voir ça se fait et ça se passe bien !! Cela vaut aussi pour Viviana, l'italienne du LAN !! Je penserai bien à vous les filles !

Sylvie, je voulais te remercier pour avoir pris le temps de répondre à mes questions, mes interrogations scientifiques et d'avoir accepté de relire et de donner ton avis sur une partie de mon manuscrit !

Mathilde, on est presque arrivées en même temps au labo ! Et 2 ans à côté, un voyage à Florence, ça crée des liens. C'était un plaisir de t'avoir pas loin et merci de m'avoir tenu compagnie devant l'HPLC !

Jean-Luc, je crois que je t'ai bien embêté pendant 3 ans, à te demander de m'installer des programmes aux noms improbables comme L^AT_EX... alors Merci ! Et j'espère bien qu'on travaillera prochainement ensemble !

Sandra, Marisa, les pauses H1 en votre compagnie...c'était super sympa ! Et je suis d'accord : H1 c'est mieux que H2 !

Jean, merci pour les conseils, pour m'avoir permis de visiter BioMérieux avec tes étudiants, et donné l'opportunité de savoir ce que c'est "qu'enseigner" !

Merci aux biologistes du LAN, Serge, Walid, d'avoir gardé votre porte ouverte pour des conseils plus "bio". Et je le redis pour la dernière fois, Serge, Aag = MPG≠MGMT !

Ewa, on ne s'est pas côtoyée longtemps mais c'est quand même toi, qui m'as appris, avec Christophe, les WB et les mésaventures qui vont avec... pour tout ça merci ! Et bonne chance pour la suite !

Un grand merci également à mes nombreux co-bureaux qui se sont succédés dans le bureau 304, Benoît, François, Coralie, Camille, Guillaume, Sigrid, Mohamed ! J'en garde de très bons souvenirs !

Je tiens également à remercier Camille et Guillaume, stagiaires M2, avec qui j'ai travaillé quelques temps et qui ont dû me supporter... Guillaume bon courage pour ces 3 années de folie !

Laure, Christophe, ça a été un immense plaisir (et réconfort) de vivre toutes les étapes de la thèse à vos côtés !!!! Nos longues discussions dans nos différents bureaux vont me manquer !!! Et merci Christophe d'avoir déblayé le terrain pour nous ! Ma p'tite Laure, tu clôtures cette saison de thèse au LAN ! Je te dois beaucoup !!

Zohra, je tiens à te remercier pour avoir été patiente avec moi et m'avoir guidée à travers les dédales des démarches administratives !

Au cours d'une seconde partie de ma thèse j'ai eu l'occasion de m'initier à la RPE. J'ai ainsi fait la connaissance de Serge Gambarelli, Vincent Maurel et Giuseppe Sicoli. A tous les trois un grand merci pour cette collaboration fort sympathique et pour avoir pris le temps de m'expliquer la RPE (c'était pas une mince affaire !!). Serge, un merci supplémentaire pour avoir essayé de

ressusciter mes orchidées ! Je remercie également l'équipe d'Yves Boulard pour avoir travaillé sur la modélisation de nos duplex d'ADN étudiés par RPE.

Je tiens également à remercier le Dr Laurent Pelletier et le Pr Bernd Kaina de nous avoir fourni du matériel biologique pour valider notre approche.

Merci également aux autres habitants du C5 que j'ai eu l'occasion de croiser (ou plus !) et qui ont égayé mon séjour, en particulier Nico, Gaylord, Colette, Sarah, Marjorie, Fabrice...

Je finirai par remercier les personnes que j'ai côtoyées durant ces 3 années et qui ont parfois dû me supporter. Tout d'abord ma famille, et en particulier ceux qui ont relu de bon coeur mon manuscrit : Merci, merci ! Je remercie également mes amis ! Ça compte d'avoir des personnes bienveillantes, qui entourent et remontent le moral !! En particulier je remercie Mag pour avoir été là quand j'en avais besoin. Je remercie aussi Rémi, en tant qu'ami mais également en tant que support informatique !!!! Et enfin, un grand merci à Julien, ça a pas toujours été facile mais tu as été patient et t'as bien assuré ! A mon tour de prendre le relais !

Table des matières

Avant-propos	1
1 Étude bibliographique	3
1.1 L'ADN : structure et fonction	4
1.2 Les lésions de l'ADN	6
1.2.1 Les lésions peu volumineuses	6
1.2.1.1 Les mésappariements	7
1.2.1.2 Les hydrolyses	7
1.2.1.3 Les modifications des bases	10
1.2.1.4 Les lésions multiples	13
1.2.2 Les lésions volumineuses	13
1.2.2.1 Les photoproduits	13
1.2.2.2 Les alkylations de type mono-adduits et pontages	14
1.2.2.3 Les pontages ADN-protéines	15
1.2.3 Les cassures de chaînes	16
1.2.3.1 Les cassures simple brin	16
1.2.3.2 Les cassures double brin	17
1.3 Réponses biologiques de la cellule aux lésions de l'ADN	17
1.4 La réparation des lésions de l'ADN	18
1.4.1 La réparation par excision de nucléotides	18
1.4.2 La réparation des mésappariements	21
1.4.3 La réparation des cassures double brin	22
1.4.4 La réparation par excision de base	22
1.4.5 La réparation par réversion	22
1.5 La réparation par excision de base	24
1.5.1 Le mécanisme de la BER	24
1.5.2 Quelques enzymes importantes de la BER	29
1.5.2.1 La réparation de l'uracile et l'uracile N-glycosylase	29
1.5.2.2 La 8-oxoguanine glycosylase humaine et la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase	32
1.5.2.3 L'AP-endonucléase humaine	34
1.5.2.4 L'alkyladénine glycosylase	36
1.6 La réparation par réversion	38
1.7 Lien entre la réparation de l'ADN (BER et RR) et certaines pathologies	41

1.7.1	Liens entre la BER et le cancer	41
1.7.1.1	La BER et son implication dans cette pathologie	41
1.7.1.2	La BER comme cible thérapeutique anticancéreuse	43
1.7.2	Liens entre la réparation par réversion et le cancer	45
1.7.2.1	La réparation par réversion et son implication dans cette pathologie	45
1.7.2.2	La MGMT comme cible thérapeutique anticancéreuse	46
1.8	Les méthodes de détection des activités de réparation de l'ADN	48
1.8.1	Les méthodes "cellulaires"	48
1.8.2	Les méthodes <i>in vitro</i>	51
Objectifs		55
2	Mise au point de la biopuce à ADN pour cibler la voie de la BER	57
2.1	Stratégies de greffage d'ADN sur support solide	58
2.2	Caractérisation de la biopuce	62
2.2.1	Caractérisation de la sonde oligonucléotidique	62
2.2.2	Caractérisation des lames	63
2.3	Choix du catalyseur et de la concentration en sonde à greffer	65
2.4	Choix du tampon de spotting	67
2.5	Spécificité de la réaction de greffage	69
2.6	Application à la détection des mésappariements	70
2.7	Application à l'étude de la réparation de l'ADN	73
2.7.1	Détection de l'activité d'excision de la Formamidopyrimidine-ADN- glycosylase	75
2.7.2	Détection de l'activité d'hydrolyse de l'AP-endonucléase humaine	77
2.7.3	Problèmes rencontrés et solutions envisagées	78
2.8	Conclusions	80
3	Biopuce à hairpins pour détecter la réparation de l'ADN	81
3.1	Biopuce à hairpins pour la détection d'activités de réparation de la BER	83
3.1.1	Conception des sondes et de la biopuce	83
3.1.1.1	Choix de la configuration	83
3.1.1.2	Séquences des sondes nucléiques	89
3.1.1.3	Cinétique d'immobilisation des sondes nucléiques	91
3.1.2	Principe de la biopuce	92
3.1.3	Validation de la biopuce à ADN ciblant la BER	93
3.1.3.1	Détection des activités de la BER à partir d'enzymes purifiées	93
3.1.3.2	Détection des activités de la BER à partir d'extraits cellulaires	94
3.1.4	Limitations et essais d'amélioration du système	97
3.1.4.1	Étude des conditions enzymatiques	97
3.1.4.2	Travail sur l'accessibilité des sondes	98
3.1.4.3	Conclusions	109
3.1.5	Applications à l'étude d'inhibiteurs de la réparation	109

3.1.5.1	L’Ugi, un inhibiteur de l’UNG	109
3.1.5.2	La méthoxyamine, un inhibiteur d’Ape1	111
3.1.5.3	Conclusions	113
3.2	Biopuce à sondes hairpins pour détecter la réparation des bases alkylées	114
3.2.1	Activité de l’Alkyladénine ADN-glycosylase	115
3.2.1.1	Activité de l’enzyme purifiée et d’un extrait nucléaire HeLa	115
3.2.1.2	Étude des activités de réparation de lignées cancéreuses de glioblastomes humains U373	120
3.2.2	Détection de l’activité de la O ⁶ -méthylguanine ADN-méthyle transférase	126
3.2.2.1	Méthodes de détection de cette activité	126
3.2.2.2	Principe de la biopuce pour détecter l’activité enzymatique de la MGMT	127
3.2.2.3	Activité enzymatique de la protéine purifiée	129
3.2.2.4	A partir d’extraits cellulaires	131
3.3	Conclusions	134
4	Étude structurale des lésions de l’ADN par RPE pulsée	139
4.1	La RPE pulsée pour l’étude des structures de l’ADN	140
4.2	Contexte général et objectifs de l’étude	143
4.2.1	Stratégies de marquage de l’ADN pour les études de RPE pulsée	143
4.2.2	Objectifs de l’étude	146
4.3	Étude de la stratégie de marquage de l’ADN par chimie click	146
4.3.1	Marquage radicalaire par chimie click	147
4.3.2	Mesures des températures de fusion des duplex bi-marqués	148
4.3.3	Mesures des distances par RPE pulsée	150
4.4	Détection de déformations induites par des lésions de l’ADN	153
4.4.1	Mesure du changement structural induit par le THF	153
4.4.2	Mesure du changement structural induit par des adduits platinés	155
4.4.2.1	Intérêts de l’étude des adduits platinés	155
4.4.2.2	Préparation des oligonucléotides platinés	156
4.4.2.3	Détermination des distances par RPE pulsée	157
4.5	Application à un système complexe en “triangle”	163
4.5.1	Élaboration et étude d’un duplex d’ADN tri-marqué	163
4.5.2	Application à la détection d’une interaction ADN-protéine	166
4.6	Conclusions	168
	Conclusion	171
5	Matériels et méthodes	175
5.1	Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques	176
5.2	Caractérisation des sondes oligonucléotidiques	177
5.3	Analyse d’une activité enzymatique en solution à l’aide d’une sonde hairpin	178
5.4	Protocoles liés aux biopuces	179
5.4.1	Fonctionnalisation des lames azotures	179

5.4.2	Tampons et réactifs	180
5.4.3	Immobilisation des sondes oligonucléotidiques sur support par "chimie click"	180
5.4.4	Protocole d'hybridation pour la détection de mismatch sur lames	181
5.4.5	Protocole d'hybridation et d'incubation enzymatique pour les lames "hairpins"	182
5.4.6	Détection de l'activité de la MGMT sur lame	182
5.4.7	Détermination de la densité des lames	183
5.5	Enzymes et tampons enzymatiques utilisés	183
5.6	Préparation d'un extrait nucléaire à partir de cellules	183
5.7	Protocoles liés aux analyses par RPE pulsée	185
5.7.1	Marquage des sondes par des nitroxydes par chimie click	185
5.7.2	Mesures des températures de fusion	185
5.7.3	Préparation des échantillons pour les analyses en RPE pulsée	186
5.7.4	Détermination des distances par RPE pulsée	186
5.7.5	Préparation des oligonucléotides contenant les lésions platinées	186
5.7.6	Digestion par les exonucléases des oligonucléotides contenant les lésions platinées	187
5.7.7	Préparation des sondes nucléiques duplex "tri-marquées"	187
Bibliographie		189
Annexes		211
A Séquences des sondes oligonucléotidiques utilisées		213
B Rapport de stage de master 2 de Guillaume Gines		217
C Liste des communications scientifiques		241

Liste des symboles

8-oxoG 7,8-dihydro-8-oxoguanine

Aag Alkyladénine glycosylase

ADN Acide désoxyribonucléique

Ape1 AP-endonucléase humaine

ARN Acide ribonucléique

BCNU 1,3-bis(2-chloroethyle)-1-nitrosourée

BER Réparation par excision de base

BSA Sérum albumine bovine

CHO Chinese hamster ovary cells

CV Coefficient de variation

cy3 Cyanine 3

cy5 Cyanine 5

DEER Double double electron resonance

DIPEA Diisopropyléthylamine

DMSO Diméthylesulfoxyde

EcoRI Enzyme de restriction EcoRI

EGTA Acide éthylène glycol tetraacétique

eq Equivalent

Fpg Formamidopyrimidine ADN glycosylase

FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer

GFP Green Fluorescent Protein

HAP Hydrocarbure aromatique polycyclique

HCR Host cell reactivation

HeLa Lignée cellulaire cancéreuse issue d'un prélèvement de métastases d'une patiente, Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus

HEX 5'-hexachlorofluorescéine
 HR Homologous recombination
 HRP Horseradish peroxidase
 MBD4 Methyl CpG binding domain 4
 MDA Malondialdéhyde
 MEF Mouse embryo fibroblast
 MGMT Méthylguanine-ADN méthyle transférase
 MNNG N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
 N7MeG N7-Méthyle-guanine
 NHEJ Nonhomologous end joining
 NP1 Nucléase P1
 OGG1 Oxoguanine DNA glycosylase 1
 PAGE Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
 PCR Polymérase Chain Reaction
 PELDOR Pulsed electron double resonance
 PstI Enzyme de restriction PstI
 qsp quantité suffisante pour
 r-HPLC Chromatographie liquide haute performante en phase inverse
 RMN Résonnance magnétique nucléaire
 RPE Résonnance paramagnétique électronique
 SDSL Site-directed spin labeling
 siARN silencing ARN
 SMUG1 Single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase
 SPRi Imagerie par résonnance plasmonique de surface
 TDG Thymine DNA glycosylase
 TEAA Acétate de triéthylammonium
 TEMPO 2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-N-oxyle
 Tm Température de fusion
 TMZ Témzolomide
 U373 Lignée cellulaire de glioblastomes humains
 Ugi Uracil-DNA-Glycosylase Inhibitor
 UNG Uracile-N-glycosylase

Avant-propos

Le manuscrit présenté ici rassemble les résultats obtenus au cours de mes trois années de thèse portant sur le développement de nouvelles sondes oligonucléotidiques pour l'étude structurale des lésions de l'ADN et leur réparation. Ainsi, ce travail comporte deux volets distincts, le premier portant sur l'étude de la réparation de l'ADN et le second sur les aspects structuraux des lésions.

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres. Le premier chapitre expose le contexte général des lésions de l'ADN et de leur réparation. Les chapitres 2 et 3 traitent du développement d'un nouveau biocapteur pour mesurer certaines activités enzymatiques de la réparation de l'ADN. Le chapitre 4, quant à lui, traite de la seconde partie de ce travail de thèse et synthétise les résultats portant sur le développement de nouvelles sondes oligonucléotidiques pour la détection, par résonance paramagnétique électronique (RPE), des déformations structurales induites par certaines lésions de l'ADN. Enfin, le chapitre 5 expose les différentes méthodes utilisées au cours de ces études.

Chapitre 1

Étude bibliographique

Sommaire

1.1	L'ADN : structure et fonction	4
1.2	Les lésions de l'ADN	6
1.2.1	Les lésions peu volumineuses	6
1.2.2	Les lésions volumineuses	13
1.2.3	Les cassures de chaînes	16
1.3	Réponses biologiques de la cellule aux lésions de l'ADN	17
1.4	La réparation des lésions de l'ADN	18
1.4.1	La réparation par excision de nucléotides	18
1.4.2	La réparation des mésappariements	21
1.4.3	La réparation des cassures double brin	22
1.4.4	La réparation par excision de base	22
1.4.5	La réparation par réversion	22
1.5	La réparation par excision de base	24
1.5.1	Le mécanisme de la BER	24
1.5.2	Quelques enzymes importantes de la BER	29
1.6	La réparation par réversion	38
1.7	Lien entre la réparation de l'ADN (BER et RR) et certaines pathologies	41
1.7.1	Liens entre la BER et le cancer	41
1.7.2	Liens entre la réparation par réversion et le cancer	45
1.8	Les méthodes de détection des activités de réparation de l'ADN . .	48
1.8.1	Les méthodes "cellulaires"	48
1.8.2	Les méthodes <i>in vitro</i>	51

1.1 L'ADN : structure et fonction

La première mise en évidence de l'existence de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fut établie par Friedrich Miescher en 1869. Celui-ci, travaillant sur l'identification des composés biochimiques des cellules, observa un précipité blanc lors de l'isolation de leucocytes (globules blancs) issus de pus de bandages chirurgicaux. Montrant que cette substance provenait du noyau, il la nomma nucléine. Il étudia la composition chimique de cette substance et y trouva la présence de phosphore organique, différenciant ainsi la nucléine de toute protéine connue [Dahm, 2008].

La composition de l'ADN à savoir les bases (purines et pyrimidines), la molécule de sucre et le lien phosphate, fut découverte par la suite grâce aux travaux d'Albrecht Kossel et Phoebus Levene (figures (1.1) et (1.2)) [Dahm, 2008, Levene, 1919]. Le terme de nucléotide, regroupant une base, un sucre et un groupement phosphate fut introduit par Phoebus Levene.

Ce n'est qu'en 1944 que l'ADN fut proposé par Oswald Avery, Colin MacLeod et Maclyn McCarthy comme le matériel contenant l'information génétique, hypothèse confirmée en 1952 par les travaux de Al Hersey et Marta Chase [Avery *et al.*, 1944, Hershey et Chase, 1952].

Entre 1940 et 1951, Erwin Chargaff montra que l'ADN comportait autant d'adénines que de thymines et autant de cytosines que de guanines [Chargaff et Vischer, 1949, Chargaff, 1951]. Se basant sur ces études, ainsi que sur des travaux de diffractions des rayons X effectués l'année suivante par Rosaling Franklin et Maurice Wilkins, James Watson et Francis Crick établirent la structure en double hélice de deux brins anti-parallèles de l'ADN. Leur modèle de la molécule d'ADN fait apparaître la complémentarité des bases via des liaisons hydrogènes (figures (1.1) et (1.2)) [Dahm, 2008].

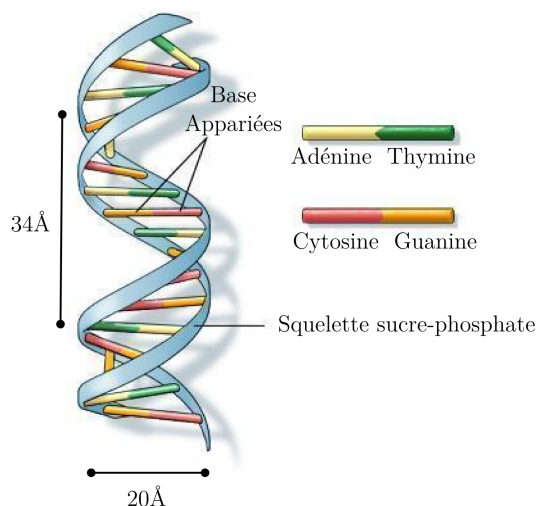


Figure 1.1 – Représentation schématique de la structure de la double hélice d'ADN.

Il est bien connu aujourd'hui que la molécule d'ADN est le support de l'information génétique chez les êtres vivants. C'est elle qui permet la synthèse des protéines via les mécanismes de transcription et de traduction. En effet, chez les cellules eucaryotes¹, un gène à traduire en protéine est dans un premier temps transcrit en une molécule d'ARN (Acide RiboNucléique) pré-messager,

¹Les cellules eucaryotes se différencient des cellules procaryotes par le fait qu'elles possèdent une membrane délimitant un compartiment cellulaire appelé noyau qui contient l'ADN.

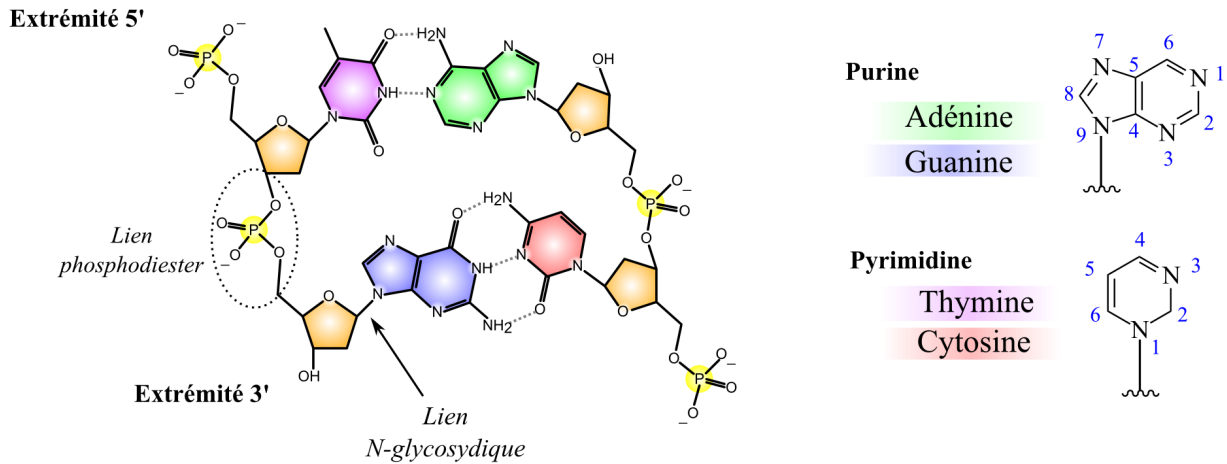


Figure 1.2 – Structure chimique de la molécule d'ADN et complémentarité des bases (purines et pyrimidines) de l'ADN.

qui est ensuite épissée en un ARN messager ne possédant que les séquences codantes. Cet ARN messager est alors exporté dans le cytoplasme dans lequel il est traduit en protéine. Les bases de la molécule d'ARN ne diffèrent que légèrement de celles de l'ADN puisque seule la base thymine est remplacée par la base uracile (figure (1.3)). Notons néanmoins que l'ADN et l'ARN se différencient par leur sucre, désoxyribose pour le premier, et ribose pour le second.

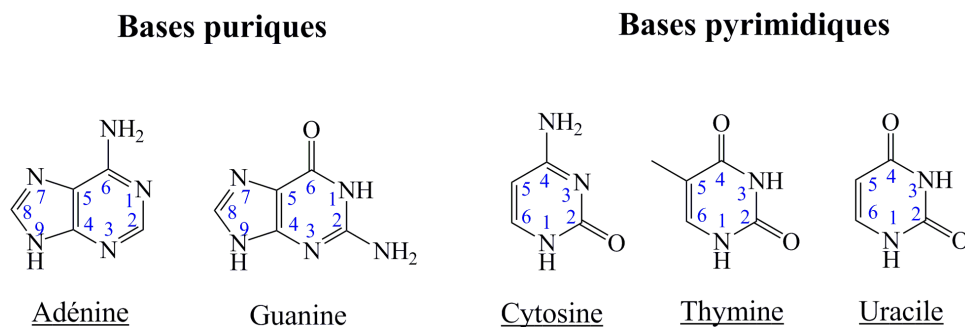


Figure 1.3 – Structures chimiques des bases de l'ADN et de l'ARN.

La conservation de l'information génétique au cours des différents cycles cellulaires est assurée grâce au mécanisme de réplication de l'ADN qui fait intervenir une enzyme appelée ADN polymérase. Au cours de la phase S du cycle cellulaire chaque brin de la molécule initiale d'ADN sert de modèle pour la synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN identique. La réplication de l'ADN est dite semi-conservative car la nouvelle molécule d'ADN est constituée d'un brin initial et de son complémentaire nouvellement formé. La synthèse d'ADN est assurée par une enzyme appelée ADN polymérase qui ajoute des désoxyribonucléotides à partir de désoxyribonucléotides triphosphate, notés dNTP (dATP, dGTP, dCTP ou dTTP).

1.2 Les lésions de l'ADN

L'ADN étant une molécule essentielle pour la vie des cellules, il est très important de préserver son intégrité. Or celle-ci est constamment soumise à des stress pouvant l'endommager. Les sources de ces dommages peuvent être d'origine exogène (rayons ultra-violet, agents chimiques...) ou d'origine endogène (espèces réactives de l'oxygène dues au métabolisme cellulaire, erreurs de réplication...) (figure (1.4)) [Hoeijmakers, 2001]. Plusieurs sites de dommages sont accessibles : les bases, le sucre désoxyribose et les groupements phosphate reliant les nucléotides. Si l'on considère les altérations spontanées, c'est-à-dire sans intervention d'un agent extérieur, celles-ci auront tendance à mettre en oeuvre des réactions d'oxydation et d'hydrolyse. Ces lésions de l'ADN peuvent être de natures différentes et induire des déformations de la structure secondaire de l'ADN plus ou moins importantes.

Nous avons détaillé ci-après différentes catégories de lésions en différenciant d'une part les dommages des bases peu volumineux de l'ADN c'est à dire induisant une faible déformation de la structure secondaire de l'ADN, et d'autre part les dommages des bases volumineux, induisant une déformation plus importante. Nous avons ajouté une troisième catégorie regroupant les cassures de chaînes (simple et double brin).

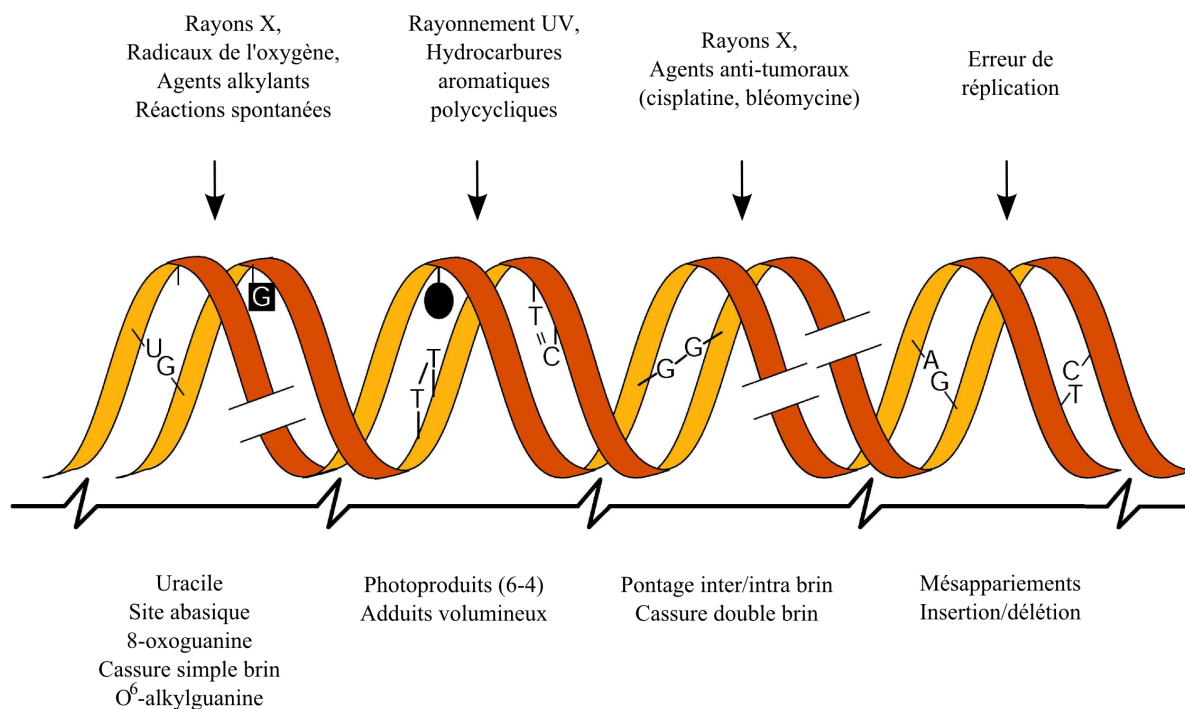


Figure 1.4 – Principales lésions de l'ADN et leurs origines, adapté de [Hoeijmakers, 2001].

1.2.1 Les lésions peu volumineuses

Dans cette catégorie de lésions des bases de l'ADN, nous distinguons les mésappariements qui font intervenir des bases normales de l'ADN, les réactions chimiques d'hydrolyse pouvant mener à la perte d'une base, ou encore les réactions chimiques les modifiant.

1.2.1.1 Les mésappariements

Les mésappariements de bases peuvent provenir d'une erreur de réplication de l'ADN ou de la présence d'une base modifiée mutagène dans la séquence.

La réplication de l'ADN par les ADN polymérase n'est pas toujours fidèle. En effet, parfois, les polymérases incorporent un nucléotide non-complémentaire au brin parent ce qui conduit à des mésappariements. Il est également possible d'avoir des délétions de nucléotides ou des insertions produisant un décalage de l'un des deux brins et ainsi un mauvais appariement.

Certaines bases lésées ne bloquent pas la réplication de l'ADN et sont source de mésappariements. C'est le cas, par exemple, de la O⁶-méthylguanine issue de la méthylation d'une guanine. Si elle n'est pas réparée, cette base n'est plus reconnue comme une guanine mais comme une adénine et sera ainsi mésappariée à une thymine (voir paragraphe "Les alkylations" page 10). De même l'uracile, issue de la désamination de la cytosine n'est plus reconnue comme une cytosine mais comme une thymine qui sera alors mésappariée à une adénine (voir paragraphe "Les bases désaminées" page suivante).

1.2.1.2 Les hydrolyses

Plusieurs sites de l'ADN sont potentiellement hydrolysables. L'hydrolyse² peut se produire au niveau du lien N-glycosydique reliant la base au sucre, ce qui conduit à des sites abasiques, ou encore sur les amines exocycliques des bases, mécanisme qui conduit à ce que nous nommerons des bases désaminées.

Les sites abasiques

Les mécanismes de formation de sites abasiques

Il se produit fréquemment une hydrolyse spontanée du lien N-glycosydique reliant la base au sucre. Cela conduit à la formation d'un site dit abasique, noté site AP. Cette réaction concerne aussi bien les bases puriques (adénine et guanine) que les pyrimidiques (thymine et cytosine). Il semble néanmoins que la dépurination (perte d'une base purique) se produise plus fréquemment que la dépyrimidination [Lindahl, 1993]. De plus, il a été montré qu'une alkylation sur les positions N⁷ et N³ des nucléosides puriques (adénosine et guanosine) rendait le lien N-glycosydique plus labile [Loeb et Preston, 1986]. Les sites abasiques sont également des intermédiaires de réaction lors de la réparation par excision de base (voir section 1.5 page 24).

Conséquences de la formation des sites abasiques

Les sites abasiques sont connus pour être cytotoxiques³ s'ils ne sont pas réparés. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer cette cytotoxicité. Tout d'abord, le site abasique existe sous une forme fermée, mélange racémique⁴ des hémiacétales α et β , et une forme ouverte du cycle composé d'un aldéhyde ou d'un aldéhyde hydraté (figure (1.5)). La forme ouverte, présente en faible quantité (~1% de l'ensemble des formes sous lesquelles se trouve un site abasique), peut se réarranger et conduire à des cassures de chaîne et ainsi être toxique pour les cellules (voir paragraphe 1.2.3 page 16).

²Une hydrolyse est un mécanisme chimique de décomposition d'un produit par une molécule d'eau.

³On parle de cytotoxicité d'un produit lorsque celui-ci est toxique pour la cellule.

⁴Un mélange racémique est le mélange des deux énantiomères (molécules isomères images l'une de l'autre dans un miroir) d'une molécule chirale (molécule non superposable à son image dans un miroir).

Les sites abasiques peuvent également agir comme des poisons des topoisomérases [Liu et Gerson, 2004, Kingma et Osheroff, 1998]. Les topoisomérases sont des protéines clefs dans les processus de réplication et de recombinaison. Lorsqu'un site abasique est présent dans le site de reconnaissance des topoisomérases I ou II, cela gêne leur fonctionnement normal. Entre autres, cela peut stimuler leur activité de coupure de l'ADN ou encore les piéger en formant un complexe covalent avec l'ADN [Kingma et Osheroff, 1998, Abbotts et Madhusudan, 2010].

La toxicité des sites abasiques est aussi associée au fait qu'ils peuvent réagir avec les protéines et former des pontages ADN-protéines qui interfèrent avec la réplication de l'ADN [Abbotts et Madhusudan, 2010].

Enfin, les sites abasiques peuvent interférer directement avec les ADN et ARN-polymérases qui s'arrêtent au niveau du site abasique et se dissocient de l'ADN, ce qui conduit à des cassures de chaînes ou à des événements transcriptionnels avortés ou non-productifs. Si cela se produit à une fréquence importante, cela conduit à un dysfonctionnement ou à la mort cellulaire [Wilson et Barsky, 2001].

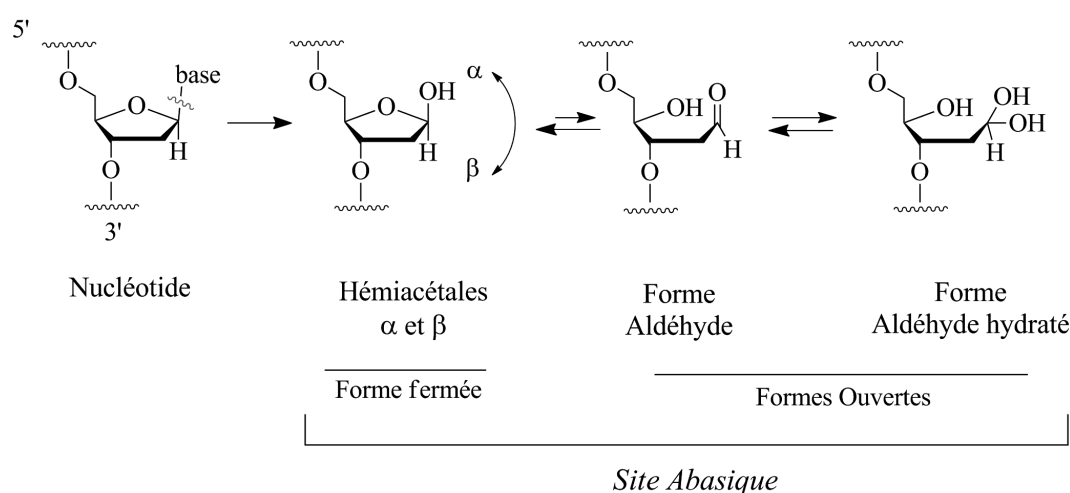


Figure 1.5 – Équilibre entre les différentes formes du site abasique : la forme fermée (hémiacétales α et β) et forme ouverte (aldéhyde ou aldéhyde hydraté).

Les sites abasiques sont également très mutagènes s'ils ne sont pas réparés. Il est connu que, chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*), l'adénine est la base préférentiellement incorporée en face d'un site abasique. De manière générale, en ce qui concerne les eucaryotes, aucune préférence n'a pu clairement être mise en évidence [Wilson et Barsky, 2001, Loeb et Preston, 1986]. Certaines expériences avaient donné lieu à une règle, nommée "A-rule", définissant une incorporation préférentielle d'une adénine en face d'un site abasique. Néanmoins, d'autres études sur la levure et également sur des cellules de mammifères ont montré que cette règle ne s'appliquait pas de manière systématique [Kunz *et al.*, 2000].

Les bases désaminées

Il existe un autre type d'hydrolyse mettant en jeu les bases. Il s'agit de la désamination de l'amine exocyclique de l'adénine, la guanine et la cytosine et la 5-méthylcytosine⁵, ce qui conduit

⁵La cytosine est également présente dans l'ADN sous la forme de 5-méthylcytosine à hauteur de 2-8 % du nombre total de cytosines [Sousa *et al.*, 2007]. Cette méthylation est associée à la régulation des gènes.

respectivement aux bases hypoxanthine, xanthine, uracile et thymine (formules chimiques détaillées sur la figure 1.7 page 11). Néanmoins, les désaminations les plus courantes concernent la cytosine et la 5-méthylcytosine.

La cytosine se désamine spontanément en uracile. Ainsi, il est possible de trouver de l’uracile au sein de l’ADN alors que cette base est normalement spécifique de l’ARN. Cette désamination se produit de manière plus importante dans l’ADN simple brin que dans l’ADN double brin. On estime un taux de désamination de la cytosine de l’ordre de 60 à 500 par génome de mammifère par jour [Lindahl, 1993]. Si l’uracile ainsi formée n’est pas réparée, elle donnera lieu, lors de la réplication de l’ADN, à une transition⁶ de l’appariement de bases “cytosine : guanine” (noté C : G) vers l’appariement “thymine : adénine” (noté T : A) (figure (1.6a)). La base uracile peut également être introduite dans l’ADN par incorporation de désoxyuridine triphosphate (dUTP) au lieu de désoxythymidine triphosphate (dTTP) lors de la réplication de l’ADN, ce qui donne lieu à formation d’une paire U : A qui, elle, n’est pas mutagène. Il existe également un processus de désamination enzymatique de la cytosine par la voie des cytidine désaminases [Sousa *et al.*, 2007]. Les lymphocytes B possèdent notamment la désaminase AID (activation-induced deaminase), qui transforme les cytosines en uraciles au niveau des gènes des immunoglobulines. AID joue un rôle clef dans le réarrangement de ces gènes et dans la maturation des anticorps [Sousa *et al.*, 2007].

La 5-méthylcytosine qui représente environ 2-8 % du nombre total de cytosines présentent dans l’ADN, peut également être désaminée en thymine [Sousa *et al.*, 2007]. Ainsi, cela mène à la transition 5-meC : G → A : T tout comme pour la désamination de la cytosine (figure (1.6b)) [Friedberg, 2006].

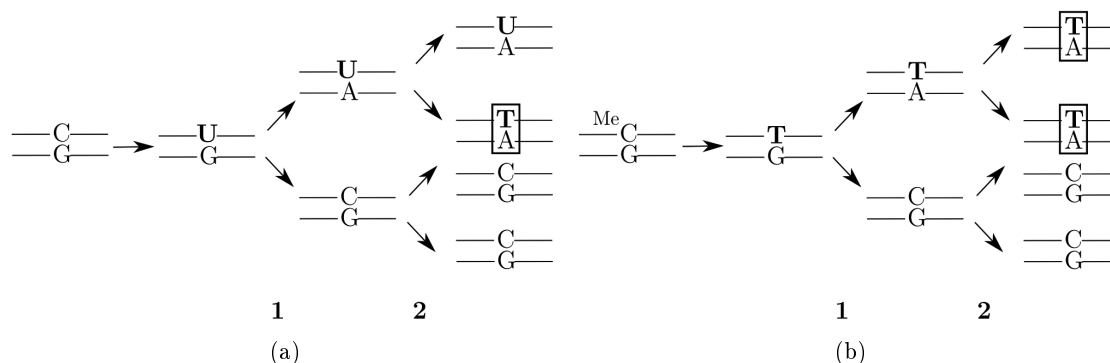


Figure 1.6 – Mutations engendrées par la désamination de la cytosine (a) et de la 5-méthylcytosine (b) au cours des deux premiers cycles de réplication de l’ADN (notés 1 et 2).

L’adénine et la guanine peuvent elles aussi se désaminer, ce qui conduit aux bases modifiées, hypoxanthine et xanthine respectivement. Ces désaminations peuvent être induites par des espèces réactives de l’azote notamment présentes dans la fumée de cigarette [Spencer *et al.*, 1995]. Le nucléoside associé à l’hypoxanthine porte le nom de désoxyinosine. L’hypoxanthine peut s’apparier avec les quatre autres bases en formant deux liaisons hydrogènes. Il semble néanmoins que l’appariement le plus stable soit obtenu avec une cytosine [Watkins et SantaLucia, 2005]. La désamination de l’adénine en hypoxanthine est potentiellement mutagène et conduit au cours de

⁶On parle de mutation de transition lorsqu’une base purique est substituée par une autre base purique (ou d’une base pyrimidique par une autre base pyrimidique). Au contraire, on parle de mutation de transversion lorsqu’il y a substitution d’une base purique par une base pyrimidique ou inversement.

la réplication à la transition $A : T \rightarrow G : C$ [Friedberg, 2006]. L'inosine est également présente au sein des ARN de transfert. La xanthine, quant à elle, pourrait conduire à un arrêt de la réplication puisqu'elle ne s'apparie de façon stable avec aucune des quatre bases de l'ADN [Friedberg, 2006].

1.2.1.3 Les modifications des bases

Les bases de l'ADN peuvent subir diverses modifications via des réactions d'oxydation⁷ ou d'alkylation⁸. Quelques unes de ces modifications sont représentées sur la figure (1.7).

Les oxydations

L'oxydation des bases vient principalement de la réaction des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN. Les espèces réactives de l'oxygène sont produites notamment lors du métabolisme cellulaire, par radiolyse de l'eau sous l'effet des rayonnements ionisants, ou encore par action des UVA [Friedberg, 2006]. On compte, à ce jour, une centaine de modifications oxydatives de l'ADN [Scharer, 2003].

La guanine est la base majoritairement oxydée du fait de son faible potentiel d'oxydation, et on dénombre actuellement 15 modifications oxydatives de cette base, comme la 7,8-dihydro-8-oxoguanine, également nommée 8-oxoguanine (8-oxoG) ou encore la fapy-guanine (FapyG). L'oxydation de la guanine conduit préférentiellement à la base lésée 8-oxoguanine [Cadet *et al.*, 2003]. Cette lésion n'est pas toxique mais est potentiellement mutagène puisqu'elle peut s'apparier à une cytosine ou à une adénine, et ainsi conduire éventuellement à la transversion $G : C \rightarrow T : A$. Cette lésion peut également se retrouver dans l'ADN par incorporation de 8-oxodGTP due à l'oxydation de dGTP. Cette mauvaise incorporation peut conduire à une transversion $A : T \rightarrow C : G$, dans le cas où la 8-oxoG est appariée à une cytosine [Lu *et al.*, 2001]. La 8-oxoG est elle-même sujette à l'oxydation, de manière plus importante que la guanine, ce qui conduit à la formation de produits tels des dérivés d'hydanthoine [Klungland et Bjelland, 2007]. La FapyG, autre base issue de l'oxydation de la guanine, est à la fois toxique et mutagène, conduisant dans ce cas à la transversion $G : C \rightarrow T : A$ [Klungland et Bjelland, 2007].

Il existe aussi d'autres types de modifications obtenues par oxydation. On dénombre environ 10 produits d'oxydation de la base adénine dont la 8-oxoadénine et la FapyA [Klungland et Bjelland, 2007]. L'oxydation de la thymine peut également conduire à la lésion thymine glycol, qui est une lésion bloquante pour la synthèse d'ADN [Liu *et al.*, 2008].

Les alkylations

Les bases peuvent être alkylées par des sources endogènes ou exogènes. En effet, de nombreux agents alkylants sont présents dans l'environnement mais ils sont aussi naturellement présents au sein des cellules. A titre d'exemple, la S-adénosylméthionine est un agent méthylant qui intervient dans de nombreuses réactions cellulaires et peut aussi générer des méthylations de l'ADN. D'autres sources exogènes telles que la N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) peuvent induire ces mêmes dommages [Lindahl, 1993, Mishina *et al.*, 2006, Drabløs *et al.*, 2004].

On distingue deux types d'agents alkylants, l'un agissant par substitution nucléophile de type 1, tel que la N-méthyle-N-nitrosourée (MNU) et l'autre par substitution nucléophile de type 2,

⁷Une réaction chimique d'oxydation est une réaction qui donne lieu à une perte d'électrons.

⁸Une réaction chimique d'alkylation correspondant à l'ajout d'un groupement alkyle.

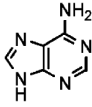
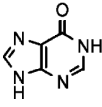
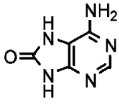
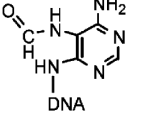
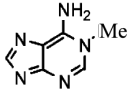
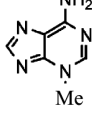
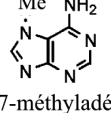
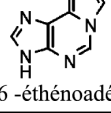
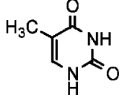
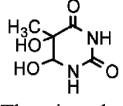
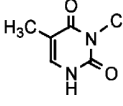
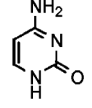
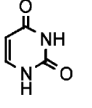
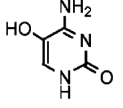
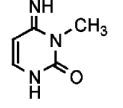
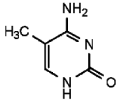
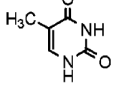
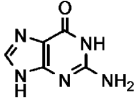
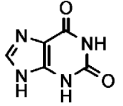
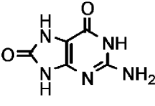
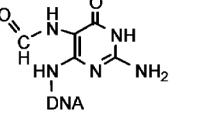
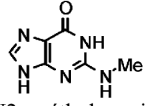
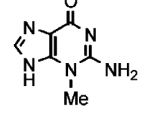
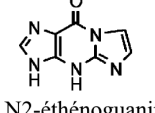
Base Normale	Désamination	Oxydation	Méthylation
 Adénine	 Hypoxanthine	 8-oxoadénine  2,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FapyA)	 1-méthyladénine  3-méthyladénine  7-méthyladénine  1,N6-éthénoadénine
 Thymine		 Thymine glycol	 3-méthylthymine
 Cytosine	 Uracile	 5-hydroxycytosine	 3-méthylcytosine
 5-méthylcytosine	 Thymine		
 Guanine	 Xanthine	 8-oxoguanine  2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG)	 N2-méthylguanine  3-méthylguanine  1,N2-éthénoguanine

Figure 1.7 – Exemple des principales modifications des bases de l'ADN formées par désamination, oxydation ou méthylation, d'après [Stivers et Jiang, 2003].

tel que le méthyle-méthanésulfonate (MMS). Ces deux types d'agents se distinguent par leur site d'attaque sur les bases (figure (1.8)). D'une manière générale, l'alkylation de l'ADN double brin se produit majoritairement sur la position N⁷ de la guanine, site le plus nucléophile et accessible et, dans une moindre mesure sur la position N³ de l'adénine. La lésion N⁷-méthylguanine n'est pas mutagène ni cytotoxique mais la lésion N³-méthyladénine est très cytotoxique. Ces deux bases alkylées peuvent conduire à une dépurination spontanée. A titre d'exemple, la demi-vie de la lésion 3-méthyladénine est de 26 h à 37 °C et pH 7 [Sedgwick *et al.*, 2007]. Certains agents méthylants de type SN₁, comme la N-méthyle-N-nitrosourée (MNU) ou la MNNG, méthylent également la position O⁶ de la guanine de manière significative et la position O⁴ de la thymine dans une moindre mesure. La O⁶-méthylguanine (O6MeG) est très mutagène et conduit à la transition G : C → A : T. Cette lésion est également associée à une forte cytotoxicité qui semble faire intervenir la voie de réparation des mésappariements (voir paragraphe 1.4.2 page 21).

Certaines molécules alkylantes sont utilisées en chimiothérapie (pour revue, voir [Siddik, 2002]). Le témozolomide (noté TMZ, figure (1.9)) par exemple, est un agent méthylant couramment utilisé pour le traitement des tumeurs cérébrales et de manière plus expérimentale pour les mélanomes⁹ [Neidle et Thurston, 2005]. Celui-ci méthyle l'ADN au niveau des positions O⁶ et N⁷ de la guanine. La carmustine, également appelée BCNU, et la fotémustine sont des molécules chloroalkylantes de la famille des nitrosourées, utilisées en chimiothérapie [Drabløs *et al.*, 2004]. Celles-ci génèrent, entre autres, des adduits sur la position O⁶ de la guanine.

La méthylation de l'ADN simple brin conduit à la formation des lésions 1-méthyladénine et 3-méthylcytosine qui sont toutes deux bloquantes pour le processus de réplication [Sedgwick *et al.*, 2007].

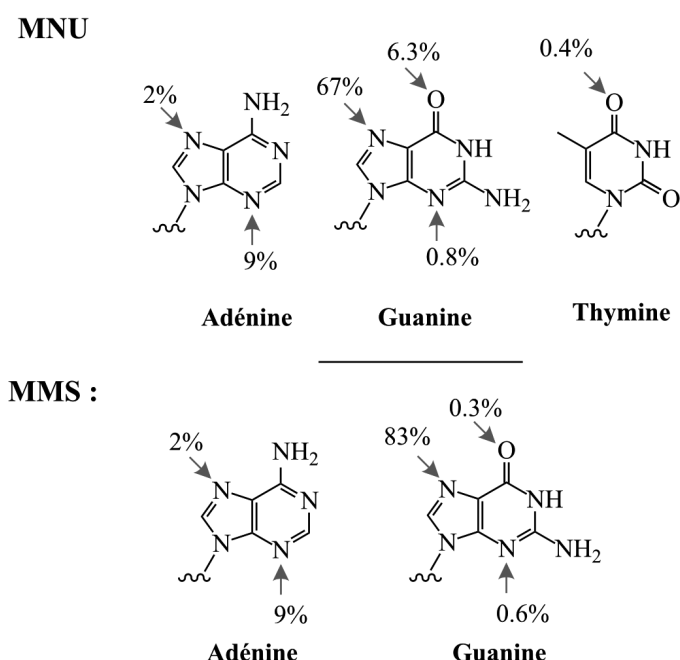


Figure 1.8 – Sites d'attaque privilégiés de la N-méthyle-N-nitrosourée (MNU) agent méthylant de type SN₁, et du méthyle-méthanésulfonate (MMS) de type SN₂, sur les bases de l'ADN double brin, adapté de [Mishina *et al.*, 2006].

⁹Les mélanomes sont un type de cancer de la peau ou des muqueuses.

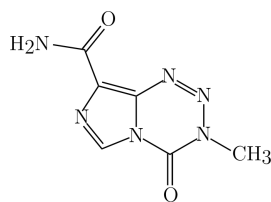


Figure 1.9 – Formule chimique du témozolomide utilisé en chimiothérapie.

1.2.1.4 Les lésions multiples

Parfois, certaines lésions que nous venons de décrire, sont regroupées sur une région peu étendue de la double hélice d’ADN (un à deux tours d’hélice). Dans ce cas, on parle de cluster de lésions. Lorsque le cluster est composé de deux lésions sur le même brin, on parle de lésions “tandem” et lorsque, au contraire, elles se trouvent sur deux brins différents, on parle de lésions bi-caténares. Le rayonnement ionisant ainsi que certains médicaments radiomimétique tels que la bléomycine, induisent de nombreuses lésions multiples [Regulus *et al.*, 2007, Eccles *et al.*, 2010]. Les clusters de lésions induits par le rayonnement ionisant sont majoritairement composés de bases oxydées, telles que la 8-oxguanine et la thymine glycol, de sites abasiques, de la lésion 2-désoxyribonolactone ou encore de cassures simple et double brin. La présence de ces lésions multiples peut conduire à des mutations ainsi qu’à la formation de cassures double brin avec une plus forte incidence que lorsque ces lésions sont isolées [Eccles *et al.*, 2010].

1.2.2 Les lésions volumineuses

1.2.2.1 Les photoproduits

Le rayonnement ultraviolet (UVA, UVB, UVC) est connu pour endommager l’ADN.

Les UVC produit par le rayonnement solaire, qui correspondent aux plus hautes énergies (<280 nm) sont totalement absorbés par la couche d’ozone et ne peuvent donc pas endommager l’ADN des cellules présentes sur la Terre.

Les UVB (280-310 nm) endommagent principalement les bases pyrimidiques. Cela conduit majoritairement à la formation de dimères entre deux pyrimidines adjacentes de type cyclobutane (CPD, figure (1.10)) et également à la formation de photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (figure (1.10)) [Ravanat *et al.*, 2001]. Les dimères cyclobutane de pyrimidines se produisent principalement entre deux thymines adjacentes. Les photoproduits (6-4), quant à eux, se forment majoritairement entre une thymine et une cytosine adjacentes [Friedberg, 2006].

Les UVA (315-400 nm), qui représentent au moins 90 % du rayonnement UV solaire, interagissent avec l’ADN de manière directe et indirecte. En effet, jusqu’à récemment ce type de rayonnement était uniquement connu pour endommager indirectement l’ADN par la formation d’espèces radicalaires de l’oxygène, qui peuvent générer des bases oxydées, des cassures de chaîne ou encore des pontages ADN-protéines. Néanmoins, il a été récemment établi que les UVA pouvaient induire des dimères cyclobutane de pyrimidines par voie directe [Mouret *et al.*, 2010].

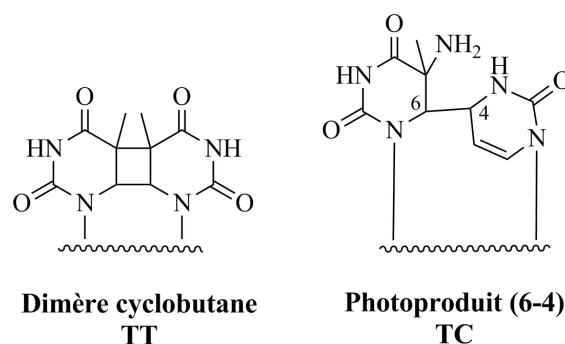


Figure 1.10 – Structures chimiques d'un dimère de thymidines de type cyclobutane, et d'un photoproduit (6-4) entre une thymine et une cytosine.

1.2.2.2 Les alkylations de type mono-adduits et pontages

Les alkylations de l'ADN développées dans cette partie, concernent l'ajout de molécules volumineuses contrairement au groupement méthyle décrit plus haut. Dans cette catégorie nous distinguons les mono-adduits concernant une seule base de l'ADN et les pontages qui lient deux sous-unités de l'ADN.

Les mono-adduits

In cellulo, la peroxydation des lipides insaturés, présents dans la membrane des cellules, conduit majoritairement à la formation de malondialdéhyde (MDA) et de 4-hydroxynonenal. Le malondialdéhyde forme des adduits avec les bases adénine, cytosine et guanine de l'ADN. L'adduit obtenu avec la guanine, du fait de son importante électrophilie, peut se ponter avec le brin complémentaire ou avec des protéines [Friedberg, 2006].

De nombreuses molécules présentes dans l'environnement peuvent s'ajouter aux bases de l'ADN. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que le benzo[a]pyrène, sont des composés organiques formés dans l'environnement par certaines industries, dont les produits de la métabolisation réagissent avec l'ADN et forment des adduits volumineux [Xue et Warshawsky, 2005].

Les pontages ADN-ADN

Certains agents vont, eux, former, dans l'ADN, des pontages intra- ou inter- brin. Parmi eux on retrouve les agents platinés tels que le cisplatine (cis-diamminedichloroplatinum(II)), le carboplatine (cis-diammine-(cyclobutane-1,1-dicarboxylato)-platinum(II)) et l'oxaliplatine (1R,2R-diaminocyclohexane-oxalato platinum(II)), utilisés en chimiothérapie (figure (1.11)). Le cisplatine, le carboplatine ainsi que l'oxaliplatine, une fois entrés dans la cellule, sont hydrolysés et réagissent alors principalement avec l'ADN, sur la position N⁷ des bases puriques. L'adduit majoritairement formé est le pontage intra-brin entre deux guanines adjacentes (intra-1,2-GpG) [Chaney *et al.*, 2005, Kelland, 2007]. On retrouve également, dans une moindre mesure, des pontages intra-brin 1,2-ApG, 1,3-GpNpG et inter-brin GG (figure (1.12)). De part leurs formules chimiques, les adduits du cisplatine et du carboplatine sont identiques. Ceux de l'oxaliplatine, bien que du même type, présentent des structures chimiques différentes.

Le cisplatine est couramment utilisé pour le traitement des cancers des testicules, des ovaires et des poumons. Son utilisation est néanmoins limitée du fait des nombreux effets secondaires qu'il produit (néphrotoxicité, neurotoxicité...) [Wang et Lippard, 2005]. Le carboplatine est, quant à lui, utilisé pour les mêmes types de cancers mais présente une toxicité moindre. Cependant, certains cancers montrent une résistance à ces traitements. D'autres dérivés du platine ont ainsi été développés afin de contrer ces limitations. L'oxaliplatine est un de ces dérivés qui est parfois efficace sur des tumeurs résistantes au cisplatine. Il est utilisé principalement pour le traitement des cancers colorectaux.

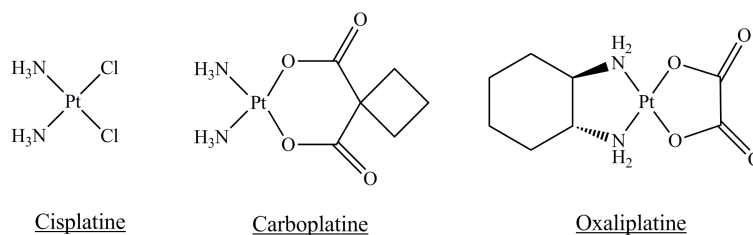


Figure 1.11 – Formules chimiques des agents platinés couramment utilisés en chimiothérapie.

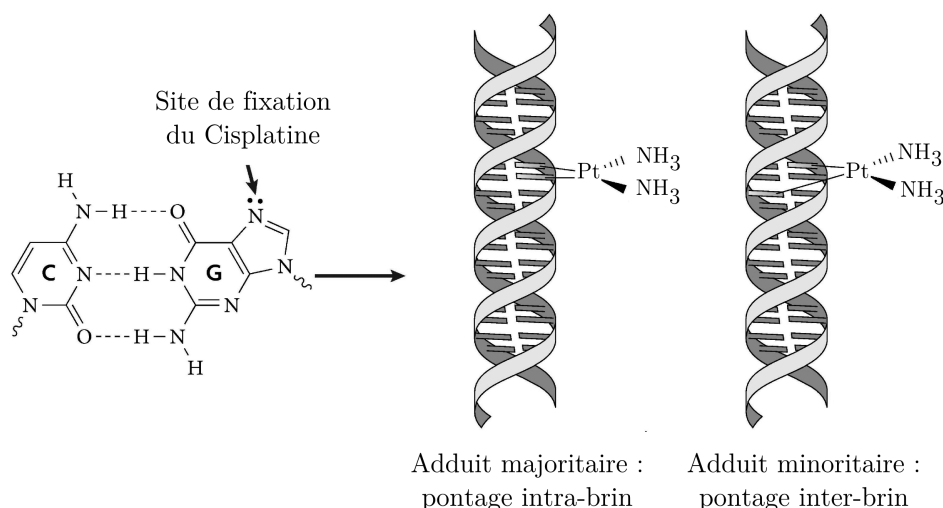


Figure 1.12 – Les adduits du cisplatine sur l'ADN (adapté de [Kelland, 2007]).

1.2.2.3 Les pontages ADN-protéines

De nombreux agents conduisent à la formation de liaisons covalentes entre l'ADN et les acides aminés des protéines. Les protéines peuvent se lier à l'ADN par des mécanismes impliquant des radicaux libres, par coordination avec un métal ou encore par l'intermédiaire d'un agent chimique pontant (le cisplatine par exemple). Le rayonnement ionisant peut directement ioniser la molécule d'ADN ou les protéines ou réagir avec les molécules d'eau et générer ainsi des espèces réactives de l'oxygène [Barker *et al.*, 2005]. Par ces mécanismes, ce rayonnement génère des pontages ADN-protéines.

Il est probable que ces lésions volumineuses interagissent avec les processus cellulaires impliquant l'ADN, tels que la réplication et la transcription. Les agents chimiothérapeutiques pouvant former des pontages ADN-protéines forment également des pontages ADN-ADN, si bien qu'il est difficile d'évaluer précisément le rôle seul des pontages ADN-protéines dans la cytotoxicité de ces médicaments.

1.2.3 Les cassures de chaînes

On distingue deux types de cassures de chaînes, celles impliquant un brin de la molécule d'ADN, les cassures simple brin, et celles impliquant les deux brins, appelées cassures double brin.

1.2.3.1 Les cassures simple brin

Nous avons vu précédemment que le lien N-glycosydique reliant les bases nucléiques au sucre ribose pouvait être hydrolysé au sein de l'ADN, ce qui conduit à la formation de sites abasiques. Le résidu ainsi formé se trouve en équilibre entre une forme cyclique et, à hauteur de 1 %, une forme ouverte contenant une fonction aldéhyde. Le lien phosphodiester, reliant deux nucléotides, peut alors être coupé via une β -élimination (figure (1.13)) [Lindahl, 1993, Friedberg, 2006].

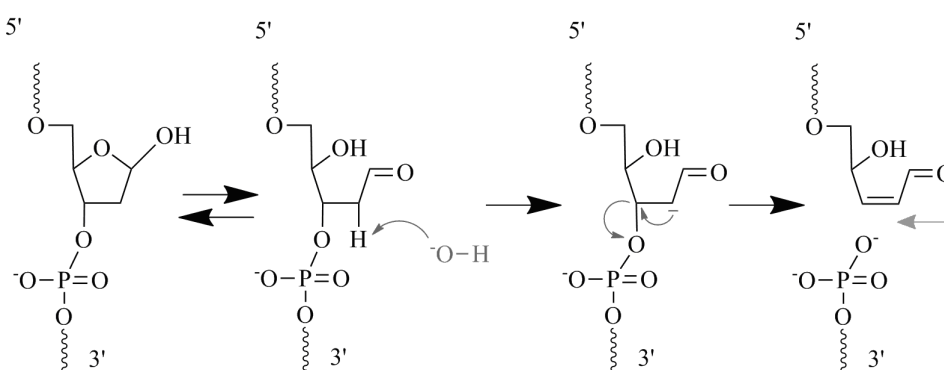


Figure 1.13 – Mécanisme de formation des cassures simple brin par β -élimination, à partir d'un site abasique.

Les espèces réactives de l'oxygène sont également connues pour dégrader le sucre désoxyribose de l'ADN et ainsi produire des cassures simple brin [Scharer, 2003, Friedberg, 2006].

D'autres agents chimiques tels que les bléomycines génèrent ce type de dommage. Les bléomycines sont une famille d'antibiotiques glycopeptides qui sont utilisés en chimiothérapie, notamment dans le traitement du cancer des testicules et de certains lymphomes. Ces molécules peuvent induire des cassures simple brin et double brin similaires à ce que l'on obtient par une exposition au rayonnement ionisant [Chen et Stubbe, 2005].

Les cassures simple brin sont par ailleurs des intermédiaires de réaction que l'on retrouve lors de la réparation de l'ADN par excision de base. Elles sont également produites par action erronée de la topoisomérase TopoI [Caldecott, 2008].

1.2.3.2 Les cassures double brin

Comme nous venons de l'expliquer, des cassures double brin peuvent apparaître lors d'une exposition au rayonnement ionisant ainsi qu'à certains médicaments antitumoraux tels que la bléomycine. Ce type de dommage se produit parfois lors de la réplication, lorsque la polymérase rencontre une cassure simple brin [Kowalczykowski, 2000].

1.3 Les réponses biologiques de la cellule face aux lésions de l'ADN

Nous avons vu que l'ADN pouvait subir de nombreuses altérations. Face à cela, la cellule a mis en place diverses stratégies de réponse pour contrecarrer les méfaits potentiels de ces dernières.

De manière très générale, lorsqu'un dommage est présent au sein de l'ADN d'une cellule, celle-ci peut le détecter et ainsi apporter une réponse adaptée, appelée "réponse aux dommages de l'ADN", soit, dans une minorité des cas, ne pas le détecter ce qui peut conduire à des mécanismes de mutagenèse. Dans le cas où les senseurs des dommages de l'ADN ont identifié une lésion, plusieurs réponses cellulaires sont connues et listées ci-dessous [Zhou et Elledge, 2000, Hoeijmakers, 2001, Sancar *et al.*, 2004].

- ★ La réparation de l'ADN : le dommage est réparé de manière fidèle ou infidèle. Si la réparation est fidèle, aucune mutation ne sera engendrée contrairement au cas d'une réparation infidèle. Cette réponse cellulaire fera l'objet de la section suivante.
- ★ L'activation des "checkpoints" des dommages de l'ADN : cela entraîne un retard ou un arrêt total du cycle cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire peut permettre la réparation de l'ADN mais peut aussi conduire à la sénescence¹⁰ (c'est notamment le cas lorsque les lésions se trouvent au niveau des télomères).
- ★ La mort cellulaire : il existe différents types de morts cellulaires pouvant être déclenchées par des dommages de l'ADN. La plus connue est l'apoptose qui est la mort cellulaire dite "programmée". La nécrose, l'autophagie ainsi que la catastrophe mitotique sont néanmoins des phénomènes parfois déclenchés suite à ces dommages.
- ★ La synthèse translésionnelle : Les dommages de l'ADN peuvent interférer avec la réplication de l'ADN mais ne la bloque pas forcément. En effet la synthèse translésionnelle permet la synthèse du nucléotide opposé à la lésion mais n'est pas toujours fidèle¹¹. Ce mécanisme consiste à remplacer la polymérase initiale (pol δ , pol ϵ , et éventuellement pol α), hautement fidèle, par une polymérase, ou une association de polymérases, moins fidèle (pol ζ à K) permettant la synthèse translésionnelle. On parle de système de tolérance [Friedberg, 2003]. Ce mécanisme peut donc donner lieu à des mutations.
- ★ Les lésions de l'ADN peuvent interférer avec la réplication de l'ADN. Nous avons vu que la synthèse translésionnelle permettait de ne pas arrêter la réplication. Un second mécanisme de "contournement" de la lésion a été mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [Hoeijmakers, 2001]. Celui-ci met en oeuvre un phénomène de recombinaison. En

¹⁰La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt (réversible ou irréversible) de la croissance des cellules.

¹¹On dit qu'une ADN polymérase est fidèle lorsque celle-ci incorpore le nucléotide correct dans la séquence du brin d'ADN qu'elle synthétise.

effet, la polymérase initiale s'arrête juste avant le dommage et recommence la polymérisation quelques nucléotides après la lésion. Une polymérase hautement fidèle se sert alors du brin fille nouvellement synthétisé à partir du brin complémentaire comme modèle pour combler le trou. Dans les deux cas, cette synthèse n'enlève pas le dommage initial.

Les dommages de l'ADN peuvent également interagir avec la transcription. En effet, l'ARN polymérase s'arrête au niveau du dommage et recrute des acteurs de la réparation de l'ADN via un mécanisme dit de "réparation couplée à la transcription" (voir paragraphe 1.4.1 page ci-contre). Lorsque le dommage bloque la transcription cela peut entraîner la mort cellulaire.

Les mutations pouvant être engendrées au cours de ces processus peuvent donner lieu à des phénomènes de cancérogénèse mais peuvent également ne pas avoir de conséquences délétères pour la cellule et participer à l'évolution de l'espèce.

1.4 La réparation des lésions de l'ADN

La réparation de l'ADN est un phénomène très important pour le maintien de l'intégrité génomique ainsi que de la viabilité des cellules face à l'ensemble des stress qu'elle subit. Ce mécanisme est conservé des cellules procaryotes aux cellules eucaryotes. L'existence d'un processus de réparation fut pour la première fois mise en évidence à la fin des années 1940, simultanément par Albert Kelner et Renato Dulbecco. Tous deux observèrent le phénomène de photoactivation par réversion des dommages UV de l'ADN. En effet, ils remarquèrent que des cellules irradiées aux UV puis subissant par inadvertance une exposition prolongée à une lumière de haute longueur d'onde (>300 nm), présentaient des taux de survie anormalement élevés [Friedberg, 2003].

A ce jour, cinq voies de réparation de l'ADN ont été identifiées : la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des mésappariements (MMR), la réparation des cassures double brin et la réparation par réversion (RR). Dans notre étude nous nous sommes principalement intéressés à la réparation par excision de base et à la réparation par réversion. Nous allons néanmoins décrire brièvement l'ensemble de ces voies avant de présenter plus en détail la BER et la RR.

1.4.1 La réparation par excision de nucléotides (NER)

La NER est la voie de réparation majoritaire des adduits volumineux. Elle s'effectue suivant des étapes similaires à celles de la BER : reconnaissance du dommage, excision d'un fragment d'ADN autour de la lésion (environ 24 à 32 nucléotides chez les eucaryotes), resynthèse et ligation. Le dommage est reconnu du fait du changement de conformation de l'ADN qu'il crée. Pour qu'une lésion soit prise en charge par cette voie de réparation, il faut néanmoins qu'il y ait une modification chimique du nucléotide altéré. Ainsi les mésappariements tout comme les insertions/délétions ne sont pas réparés par cette voie mais par le système de réparation des mésappariements (voir paragraphe 1.4.2 page 21). La NER est divisée en deux voies : la réparation globale du génome (GGR) et la réparation couplée à la transcription (TCR).

La réparation globale du génome (Global Genome NER, GGR)

La première étape consiste à reconnaître le dommage. Cette étape est réalisée chez l'homme par le complexe protéique XPC-HR23B-Cen2. Néanmoins, il a été montré que, pour les dommages générés par le rayonnement ultraviolet, le complexe protéique DDB intervenait. Le facteur TFIIH, qui est un complexe multiprotéique, est ensuite recruté et déroule l'ADN autour de la lésion. Le complexe XPA-RPA rejoint alors TFIIH et déplace la protéine XPC, laissant la place à l'endonuclease XPG qui incise le simple brin lésé à l'extrémité 3' de la lésion et au complexe ERCC1-XPF qui incise du côté 5'. L'oligonucléotide généré est alors libéré et une polymérase (pol δ ou pol ϵ) resynthétise la séquence adéquate. Une ligase (lig III ou lig I) assure alors la ligation finale (figure (1.14)) [Nouspikel, 2009].

La réparation couplée à la transcription (Transcription-Coupled Repair, TCR)

Ce mécanisme concerne uniquement le brin transcrit des gènes. Certains dommages, par exemple les dommages générés par les UV de type cyclobutane (CPD), arrêtent les ARN-polymérases (RNAPII) au niveau du dommage et donc la transcription, ce qui déclenche une réparation du brin d'ADN transcrit [Cline et Hanawalt, 2003]. Il y a alors recrutement du complexe d'incision similaire à celui du GGR via l'intermédiaire des protéines XAB2, CSA et CSB, dont les rôles ne sont pas encore totalement établis (figure (1.14)) [Tornaletti, 2009].

Déficiences de cette voie de réparation et pathologies humaines

Chez l'homme, le xeroderma pigmentosum (XP), le syndrome de Cockayne et la trichothiodystrophie sont des maladies autosomales récessives¹² associées des déficiences de cette voie de réparation de l'ADN [Lehmann, 2003]. Le xeroderma pigmentosum est dû à des mutations au sein des gènes XP (A à G) et le syndrome de Cockayne est associé à des mutations dans les gènes CS (A et B) ou XPB, XPD ou XPG. La trichothiodystrophie est, elle, liée à un défaut de certaines protéines du complexe TFIIH, dont les protéines XPB XPD et TTD-A [Nouspikel, 2009]. Ces trois maladies sont associées, en autres, à une hypersensibilité au soleil.

Les patients XP ont tendance à développer des cancers de la peau, avec une médiane de l'âge auquel le premier cancer de la peau se développe, de 8 ans [Leibeling *et al.*, 2006]. 20 % des patients XP développent également des troubles neurologiques. On compte sept groupes de complémentation XP selon les gènes mis en cause. Les patients XP montrant des troubles neurologiques appartiennent généralement aux groupes XPA, XPB, XPD ou XPG.

Les enfants atteints du syndrome de Cockayne, quant à eux, sont sujets à un retard de croissance, à des troubles ophtalmologiques comme une atrophie de la rétine et également des handicaps neurologiques et moteurs avec un retard mental. Ils ne présentent néanmoins pas d'incidence accrue au développement d'un cancer, contrairement aux patients XP [Leibeling *et al.*, 2006].

La trichothiodystrophie est caractérisée par le fait que les patients atteints de cette maladie possèdent des cheveux dystrophiques dont la matrice protéique contient moins de protéines riches

¹²On parle de maladie autosomale lorsque le gène mis en cause est porté par un chromosome non-sexuel (X ou Y). Une maladie est dite récessive lorsque son expression nécessite les deux copies du gène en cause portent la mutation responsable de la maladie.

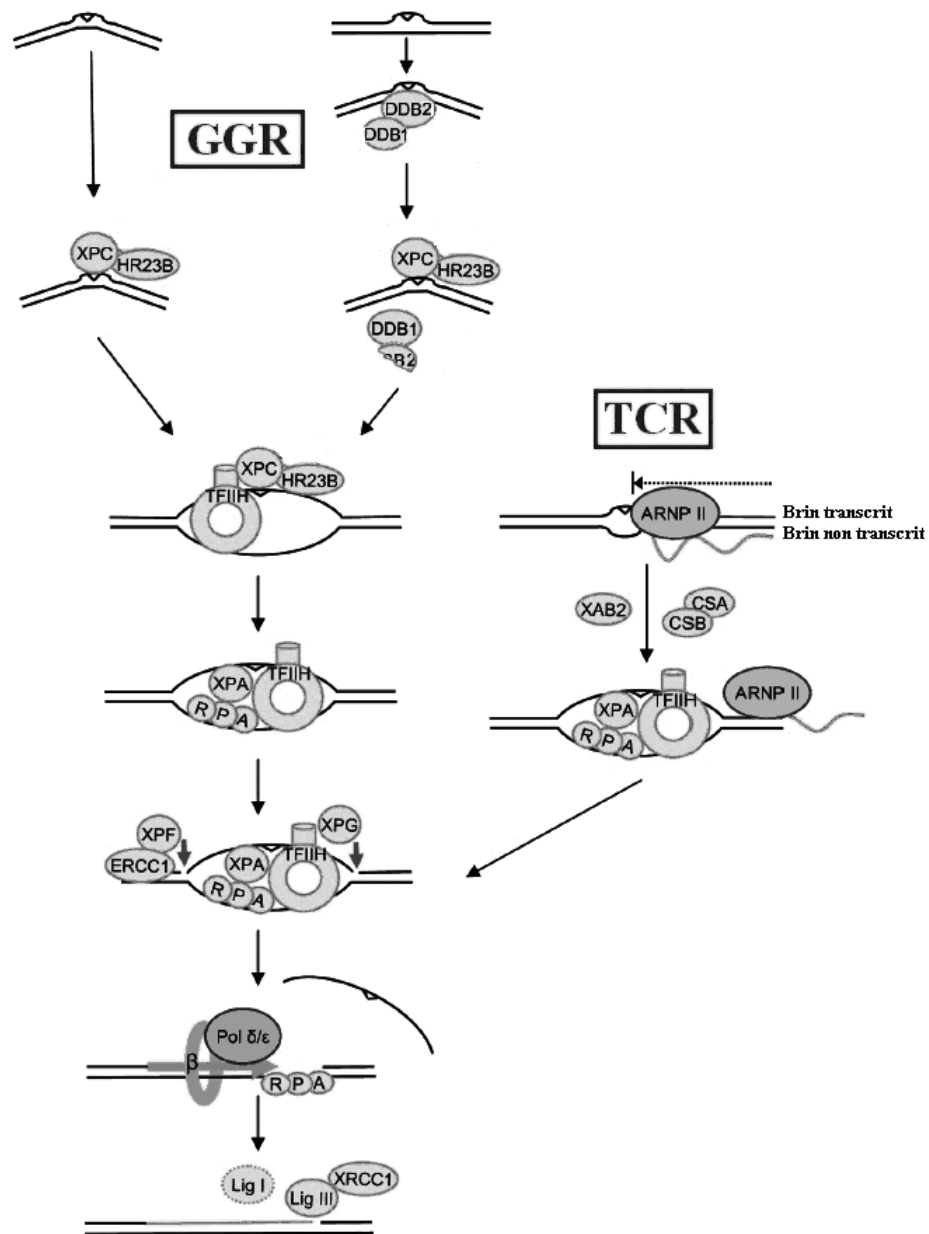


Figure 1.14 – Mécanisme de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) : Global Genome Repair (GGR) et Transcription-coupled repair (TCR), d'après [Nospikel, 2009].

en souffre. La moitié d'entre eux présentent une sensibilité accrue au soleil. Ils peuvent également présenter différents troubles neurologiques et moteurs [Leibeling *et al.*, 2006].

Pour ces trois maladies liées à des déficiences de protéines de la NER, seuls les patients XP sont sujets à des développements spécifiques de cancers.

1.4.2 La réparation des mésappariements (MMR)

Comme son nom l'indique, le MMR répare les bases mésappariées dans l'ADN qui correspondent soit à un mésappariement ponctuel soit à une insertion ou une délétion de nucléotides. Ces mésappariements peuvent provenir d'erreurs de réplication mais également de réactions chimiques comme évoquées précédemment (hydrolyse, oxydation...). Par exemple, la désamination de la 5-méthylcytosine transforme cette base en une thymine, ce qui conduit, lorsqu'elle a lieu dans l'ADN double brin, au mésappariement T : G.

La réparation de ces bases par le MMR s'effectue spécifiquement sur le brin nouvellement synthétisé. Chez *E. coli*, ce brin n'est pas méthylé contrairement au brin parent ce qui permet de les distinguer. Chez les eucaryotes, la reconnaissance se fait par la détection de cassures sur le brin nouvellement synthétisé en 3' du brin avancé ou au niveau des fragments d'Okazaki sur le brin retardé.

Chez les eucaryotes, la première étape consiste à reconnaître le dommage, via le complexe de protéines MutS (MutS α ou MutS β) et MutL α . L'hétérodimère MutS α , composé de MSH2 et MSH6, reconnaît les mésappariements impliquant une seule base ainsi que les petites insertions et délétions (une ou deux bases) [Scharer, 2003]. L'hétérodimère MutS β , composé de MSH2 et MSH3, est quant à lui impliqué dans la réparation de certaines insertions ou délétions d'une base ou plus conséquentes [Hsieh et Yamane, 2008]. L'hétérodimère MutL α est composé de MLH1 et PMS2 et est considéré comme "coordinateur" de cette réparation. Une fois le mésappariement reconnu, s'ensuit alors une succession d'étapes menant à l'excision d'une centaine de nucléotides autour du mésappariement par la protéine ExoI puis à la resynthèse de la séquence correcte [Stojic *et al.*, 2004].

Il a été montré que certaines mutations de ces protéines, notamment d'un résidu phénylalanine de MSH6 interagissant avec le mésappariement, conduisaient à une perte d'activité de réparation par cette voie [Scharer, 2003]. De plus, il a été établi un lien entre une déficience du MMR avec une résistance à certains agents antitumoraux. Comme nous l'avons vu précédemment, les agents méthylants de type SN1 induisent en partie la formation de la lésion O6MeG (voir paragraphe "Les alkylations" page 10). Cette lésion, bien que normalement réparée par l'enzyme MGMT (voir paragraphe 1.6 page 38) peut également faire intervenir la voie de réparation des mésappariements. En effet, cette lésion est très mutagène et est mésappariée lors de la réplication de l'ADN à une thymine. Si la base lésée O6MeG n'est pas réparée, ce mésappariement est reconnu par la voie du MMR qui excise la thymidine du brin nouvellement synthétisé pour remettre à nouveau une thymidine. Une hypothèse suggère que ce cycle sans fin génère des trous provoquant des cassures double brin lors de la réplication suivante ce qui finit par conduire à une activation du processus de mort cellulaire [Kaina *et al.*, 2007]. Il semble ainsi qu'une déficience dans la voie du MMR conduise à une résistance à ces agents alkylants. Il a notamment été montré qu'une déficience en MutS α conduisait à une diminution de la cytotoxicité de l'agent alkylant MNNG (N-méthyle-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) et à une diminution de

l'apoptose [Hickman et Samson, 1999].

1.4.3 La réparation des cassures double brin (HR, NHEJ)

Deux mécanismes sont connus pour réparer les cassures double brin de l'ADN : la réparation par suture des extrémités ("nonhomologous end joining" (NHEJ)) et la réparation par recombinaison homologue (HR) [Pardo *et al.*, 2009]. Chez les vertébrés, le mécanisme NHEJ semble le plus fréquemment employé pour la réparation des cassures double brin. La recombinaison homologue, qui nécessite la présence de la chromatide soeur, est néanmoins le mécanisme dominant en phase S et G2 du cycle cellulaire [Hoeijmakers, 2001].

La réparation par suture des extrémités (NHEJ)

Ce processus consiste à relier les deux brins séparés au niveau de la cassure (figure (1.15)). Dans un premier temps les extrémités sont reconnues et stabilisées par le complexe MR(X)N, composé des protéines Rad50, Mre11 et Xrs2, ainsi que par le complexe Ku/DNA-PK. Ces deux complexes semblent également jouer un rôle dans le recrutement du complexe de ligation qui intervient dans l'étape suivante pour assurer la ligation des extrémités.

La recombinaison homologue (HR)

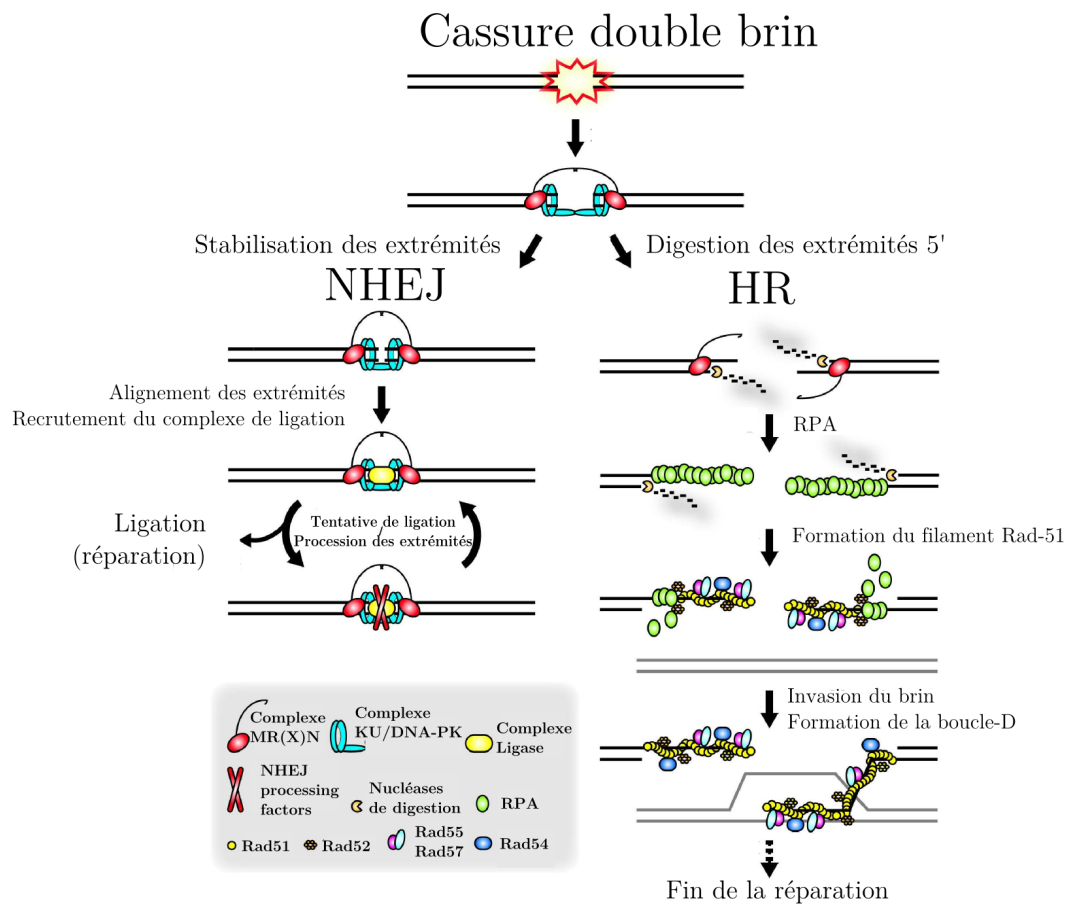
Ce mécanisme consiste à utiliser l'information portée par la chromatine soeur comme modèle pour resynthétiser la partie endommagée (figure (1.15)). Cette voie de réparation est très efficace et fidèle si l'information portée par l'ADN utilisé comme modèle est identique à la séquence d'origine. Si ce n'est pas le cas, cela peut générer des mutations. La première étape du HR consiste à digérer les extrémités 5' des brins au niveau de la cassure par le complexe MR(X)N et d'autres nucléases. Le simple brin ainsi formé est envahi par la protéine RPA qui devient alors substrat pour la formation du filament Rad51. Ce filament recherche alors une homologie de séquence et envahit le double-brin de séquence homologue. L'information génétique est ensuite retranscrite dans le brin lésé en se servant de la séquence homologue comme modèle, ce qui restaure la séquence d'origine. Il peut néanmoins y avoir, au cours de ce processus, un échange d'information (crossover) avec la chromatide soeur.

1.4.4 La réparation par excision de base (BER)

La BER est la voie privilégiée pour la réparation des petites lésions de l'ADN et sera détaillée plus loin (voir section 1.5 page 24).

1.4.5 La réparation par réversion

Cette réparation concerne chez les eucaryotes les alkylations en positions O⁶ de la guanine et O⁴ de la thymine. Chez certains autres organismes, les photoproduits sont également réparés par un mécanisme de réversion. La réparation des photoproduits et des alkylations par réversion ne fait néanmoins pas intervenir les mêmes enzymes. Cette voie de la réparation sera détaillée plus loin (voir section 1.6 page 38).

Figure 1.15 – Mécanisme de réparation des cassures double brin, d'après [Pardo *et al.*, 2009].

1.5 La réparation par excision de base (BER)

Ce mécanisme de réparation fut découvert en 1974 par Thomas Lindahl qui démontra qu'une enzyme présente chez *E. coli* était capable d'exciser la cytosine désaminée, c'est à dire la base uracile, au sein de l'ADN [Friedberg et Lindahl, 2004, Lindahl, 1974].

La réparation par excision de base est la voie majoritaire pour la réparation des petites lésions de l'ADN telles que les bases oxydées, les bases alkylées, les sites abasiques et les bases désaminées.

1.5.1 Le mécanisme de la BER

Ce mécanisme de réparation se déroule en plusieurs étapes. La première étape est la reconnaissance et l'excision du dommage suivi de l'incision de lien phosphodiester. Le résidu généré est alors enlevé ceci afin de permettre l'étape suivante de resynthèse. Le nucléotide adéquat est alors remplacé afin de reconstituer la séquence d'origine. Le mécanisme s'achève par une étape de ligation du fragment resynthétisé.

L'excision de la base et les ADN N-glycosylases

Au coeur de ce processus, interviennent des enzymes appelées ADN N-glycosylases qui initient la réparation en reconnaissant et en excisant la base endommagée [Scharer, 2003, Cline et Hanawalt, 2003, Slupphaug *et al.*, 2003]. En règle générale, chaque lésion est reconnue spécifiquement par une glycosylase. D'une manière générale, chez l'homme ces enzymes sont beaucoup plus spécifiques que chez les bactéries. Il existe néanmoins, chez l'homme, certaines redondances. Ainsi, la base endommagée peut être reconnue par différentes glycosylases selon son contexte de séquence ou encore selon si l'ADN est sous forme simple ou double brin. Le tableau (1.1) présente les différentes glycosylases humaines connues à ce jour, ainsi que certains substrats qu'elles reconnaissent. Bien que ces enzymes aient pour fonction l'excision de la base endommagée par coupure du lien N-glycosydique reliant la base au sucre, il existe deux catégories de glycosylases. On distingue ainsi les ADN N-glycosylases mono-fonctionnelles et les glycosylases bi-fonctionnelles. Les glycosylases mono-fonctionnelles, comme l'uracile N-glycosylase (UNG), possèdent uniquement la fonction d'hydrolyse du lien N-glycosydique reliant la base endommagée au sucre. Pour cela elles utilisent une molécule d'eau pour attaquer le carbone anomérique du nucléotide (figure (1.16)) [Stivers et Jiang, 2003]. Les ADN N-glycosylases bi-fonctionnelles, comme la 8-oxoguanine glycosylase (OGG1), quant à elles, hydrolysent le lien N-glycosydique et incisent également le lien phosphodiester par leur activité AP-lyase (tableau (1.1)). Contrairement aux glycosylase mono-fonctionnelles, elles utilisent un de leur résidus aminés pour exciser la base endommagée (figure (1.16)) [Stivers et Jiang, 2003]. Certaines glycosylases, utilisées au cours de notre étude, seront détaillées plus loin (voir paragraphe 1.5.2 page 29).

L'incision du lien phosphodiester

Lorsque la glycosylase est mono-fonctionnelle, elle coupe le lien N-glycosydique entre le sucre à la base lésée formant ainsi un site abasique. Une AP-endonucléase (APurinique ou APyrimidique

Glycosylase	Substrats majoritaires (base excisée en gras)	Activité AP-lyase
UNG (UNG1 : mitochondriale, UNG2 : nucléaire)	U (simple brin), U : G, U : A	Non
SMUG1	U , U : G , U : A, 5-hydroxyméthylU	Non
TDG	U : G, ϵ C : G, T : G	Non
MBD4	U / T pG : 5-meCpG , U / T : G	Non
OGG1	8-oxoG : C, FapyG : C	Oui
MYH	A : G, A : 8-oxoG	Non
Aag (MPG, ANPG)	3-MePurine , 7-MePurine , hypoxanthine , ϵ A	Non
NTH1	5-OHC , Thymine glycol : A/G, FapyG	Oui
NEIL1	8-oxoG : C, 8-oxoG : G, Thymine glycol : A/C/G, 5-OHU , 5-OHC	Oui
NEIL2	5-OHU , 5-OHC	Oui

Tableau 1.1 – Les différentes ADN N-glycosylases humaines, adapté de [Scharer, 2003, Cline et Hanawalt, 2003, Slupphaug *et al.*, 2003].

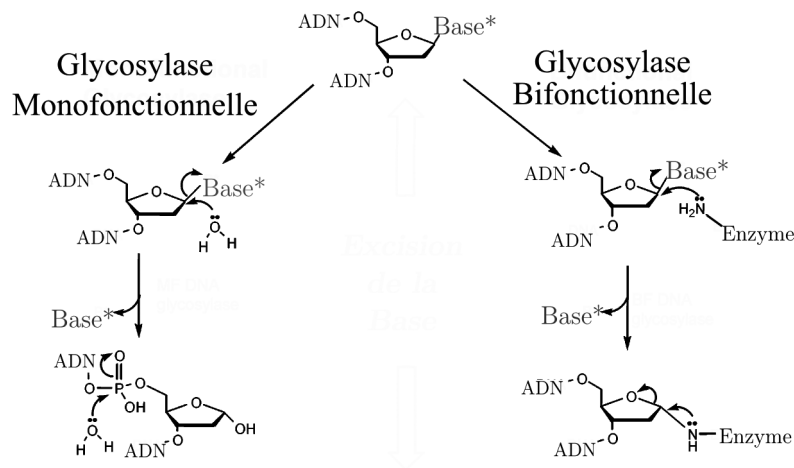


Figure 1.16 – Mécanisme d'excision de la base lésée par les glycosylases mono-fonctionnelles et bi-fonctionnelles, d'après [Stivers et Jiang, 2003].

Endonucléase, Ape1 chez l'homme) hydrolyse alors le lien phosphodiester en 5' du site abasique et génère ainsi une cassure simple brin de la molécule d'ADN. Son action conduit à une extrémité 3' OH et à un résidu 5' désoxyribose phosphate (5' dRP) (tableau (1.2)).

Lorsque la glycosylase est bi-fonctionnelle, c'est elle qui réalise l'incision du lien phosphodiester grâce à son activité AP-lyase. Elle génère ainsi une base de Schiff qui est ensuite éliminée par β - ou β,δ -élimination. L'enzyme OGG1, par exemple, utilise un mécanisme de β -élimination tandis que NEIL1 agit par β,δ -élimination. Après une β -élimination le résidu en 3' est un aldéhyde insaturé tandis qu'après une β,δ -élimination l'extrémité 3' est constituée d'un groupement phosphate. Pour ces deux mécanismes de coupure du squelette ribose-phosphate, l'extrémité 5' est un groupement phosphate. Les extrémités obtenues après incision du brin d'ADN par une AP-lyase ainsi que celles obtenues lors d'une cassure simple brin générée par un rayonnement ionisant, comme les rayons X, sont indiquées dans le tableau (1.2) [Xu *et al.*, 2008].

Substrat reconnu	Enzymes/événements créant la coupure	Extrémités autour de la cassure	Protéine requise pour la préparation des extrémités
Dommage alkylé (ex : 3-Me-Adénine)	Glycosylase mono-fonctionnelle	3' OH, 5' dRP	pol β
Site abasique	Ape1	3' OH, 5' dRP	pol β
Base oxydée (ex : 8-oxoG)	Glycosylase bi-fonctionnelle	3' aldéhyde insaturé, 5' PO ₄	Ape1
Base oxydée (ex : 5-OH-cytosine)	Ape1	3' OH, 5' OH résidu cytosine	FEN1
Base oxydée (ex : 5-OH-cytosine)	NEIL1/NEIL2	3' PO ₄ , 5' PO ₄	PNKP
Cassures simple brin	Irradiation	5' PO ₄ , 3' PO ₄ ou 3' phosphoglycolate	PNKP ou Ape1

Tableau 1.2 – Natures possibles des extrémités après l'étape d'incision lors de la BER ou d'un événement de coupure de chaîne simple brin, et protéines impliquées dans la préparation des extrémités (gap-tailoring), d'après [Almeida et Sobol, 2007].

Ces glycosylases bien qu'étant connues pour être bi-fonctionnelles peuvent également ne réaliser que l'étape d'excision de la base. En effet, il a été montré que dans certains cas (par exemple pour les glycosylases OGG1 et NTH1), Ape1 pouvait déplacer la glycosylase bi-fonctionnelle et réaliser cette étape d'incision à sa place [Marenstein *et al.*, 2003, Vidal *et al.*, 2001].

La polymérisation de l'ADN nécessite que l'extrémité 3' soit un hydroxyle et que l'extrémité 5' soit un phosphate. Une protéine est ainsi responsable du nettoyage des extrémités. Selon les extrémités obtenues, la protéine impliquée dans leur nettoyage ne sera pas la même (tableau (1.2)).

Après action d'une glycosylase mono-fonctionnelle suivie de celle d'Ape1, les extrémités sont 3' OH et 5' dRP. C'est alors pol β , aidée de la protéine XRCC1 (X-ray cross-complementing 1), qui intervient pour transformer l'extrémité 5' dRP en 5' PO₄, via son activité AP-lyase. Dans

certains cas, cette extrémité n'est pas nettoyée et la suite de la réparation se fait selon la voie dite du “long patch repair” (voir paragraphe sur l'étape de resynthèse).

Pour les glycosylases bi-fonctionnelles, l'extrémité 5' est déjà un phosphate. Il est néanmoins nécessaire de nettoyer l'extrémité 3'. Lorsque le résidu 3' est un aldéhyde insaturé, comme après action d'une glycosylase bi-fonctionnelle agissant par mécanisme de β -élimination, comme OGG1, c'est Ape1 qui nettoie cette extrémité [Almeida et Sobol, 2007]. Lorsque la réparation est cette fois initiée par une glycosylase agissant par β,δ -élimination, l'extrémité 3' est un groupement phosphate. Dans ce cas, c'est, chez les mammifères, l'enzyme PNKP (polynucleotide kinase/phosphatase) qui assure principalement cette fonction, aidée de PARP1 et XRCC1 [Almeida et Sobol, 2007]. L'AP-endonucléase, Ape1, est également connue pour avoir une capacité de coupure du 3' phosphate mais dans une moindre mesure [Wilson et Bohr, 2007].

Resynthèse de la séquence d'origine et ligation finale

Une fois l'incision réalisée, deux voies de resynthèse sont possibles : celle du “short patch repair” (majoritaire), et celle du “long-patch repair” [Wilson et Bohr, 2007]. Le choix de l'une ou l'autre des deux voies de la BER n'est pas encore complètement clair et dépend du type cellulaire, de la phase du cycle cellulaire et également du dommage présent. Par exemple, les sites abasiques spontanément formés sont généralement réparés par le “long patch repair” [Sancar *et al.*, 2004]. Il semble que ce choix dépende également de la concentration en ATP proche du site abasique formé spontanément ou après action de la glycosylase. Ainsi, à faible concentration en ATP le “long patch repair” se produit plus fréquemment, alors qu'à concentration élevée il semble que le “short patch repair” soit la voie majoritaire [Robertson *et al.*, 2009].

Le “short-patch repair” (figure (1.17))

Une fois les extrémités nettoyées, pol β aidée de XRCC1, comble la brèche avec le nucléotide adéquat. La ligase 3 α aidée, elle aussi, par XRCC1 assure ensuite la ligation finale. Cette voie est empruntée à la fois lorsque la réparation est initiée par une glycosylase mono-fonctionnelle et par une glycosylase bi-fonctionnelle.

Le “long-patch repair” (figure (1.17))

Lorsque le résidu 5' est réfractaire à l'activité AP-lyase de pol β , parce qu'il a été modifié d'une manière ou d'une autre, la polymérase pol β ajoute un nucléotide en 3' de la cassure. La polymérase pol δ ou pol ϵ ajoute ensuite plusieurs nucléotides (2 à 7, contrairement au “short-patch repair”), aidée de PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et du facteur de réplication RFC. L'endonucléase FEN1 (Flap endonucléase 1) excise ensuite l'ancien fragment de nucléotides et génère une extrémité 5'-PO₄. Pour cette voie de resynthèse la ligase LigI assure la ligation finale [Sharma et Dianov, 2007].

Les voies alternatives

Les cassures simple brin ne nécessitent pas l'intervention d'une glycosylase. Dans ce cas, la reconnaissance du dommage est assurée par la protéine PARP1 qui recrute de nombreuses

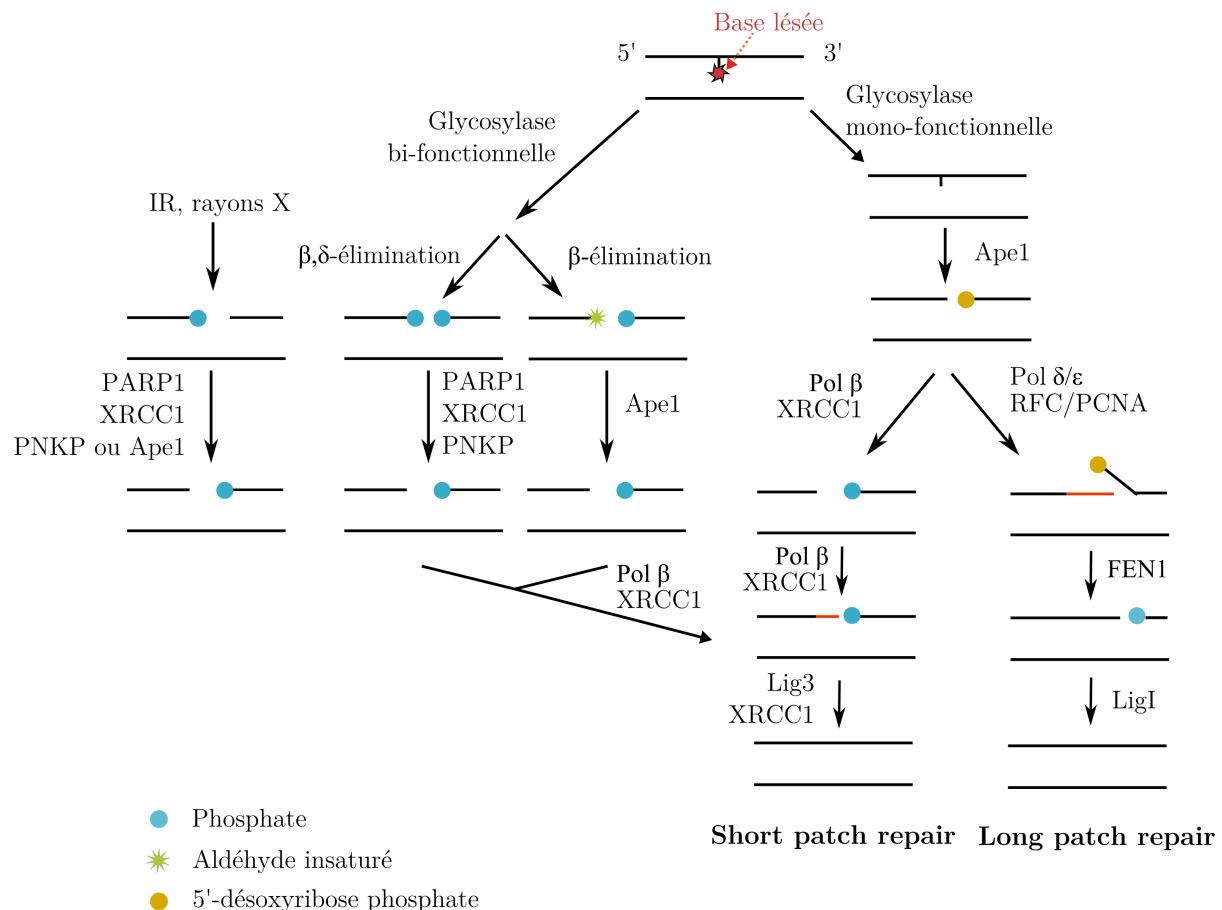


Figure 1.17 – Schéma général de la réparation par excision de base (BER).

protéines pour assurer la réparation. Une des premières protéines recrutée est XRCC1 qui interagit avec PARP1 pour former une base sur laquelle le complexe de réparation est construit [Almeida et Sobol, 2007]. La suite de la réparation est similaire au “short patch repair”.

Lorsque la réparation est initiée par les glycosylases NEIL1 ou NEIL2, la suite de réparation ne fait pas intervenir l'enzyme Ape1 pourtant présente pour les mécanismes initiés par les autres glycosylase. On sépare parfois cette voie du reste de la BER bien que certaines étapes soient communes [Almeida et Sobol, 2007]. Nous le signalons ici mais cette réparation a déjà été évoquées plus haut, lors de la description des étapes de la BER.

Récemment un nouveau mécanisme de réparation, la réparation par incision de nucléotides (NIR), a été décrite pour certains dommages oxydatifs [Ischenko et Saparbaev, 2002]. La lésion 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (5-OH-cytosine) semble par exemple pouvoir être réparée par cette voie. La NIR peut être considérée comme une autre voie possible de la BER. L'initiation de cette réparation fait intervenir essentiellement Ape1 [Almeida et Sobol, 2007]. Ape1 clive le lien phosphate en 5' du nucléotide lésé et le résidu 5' est alors pris en charge par FEN1 [Dyrkheeva *et al.*, 2007]. La suite de cette réparation est similaire aux autres voies de la BER.

1.5.2 Quelques enzymes importantes de la BER faisant l’objet de notre étude

Dans le cadre de notre travail présenté dans ce manuscrit, nous avons étudié certaines activités d’enzymes de la voie de réparation par excision de base. Aussi, nous allons développer dans cette partie les fonctions de ces enzymes.

1.5.2.1 La réparation de l’uracile et l’uracile N-glycosylase UNG

L’uracile est une base normalement présente au sein de l’ARN. Néanmoins comme nous l’avons précédemment décrit, celle-ci peut se retrouver au sein de l’ADN lors de la mauvaise incorporation de dUMP ou par désamination de la cytosine (voir paragraphe “Les bases désaminées” page 8). Plusieurs enzymes sont capables de réparer ce dommage selon le contexte de la séquence et la forme sous laquelle se trouve l’ADN (double brin ou simple brin) (tableau (1.3)). Ainsi, chez les mammifères, au moins quatre glycosylases pouvant réparer l’uracile ont été identifiées : l’uracile N-glycosylase (UNG), la “single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase” (SMUG1), la “thymine DNA glycosylase” (TDG) et la “methyl CpG binding domain 4” (MBD4) [Sousa *et al.*, 2007, Krokan *et al.*, 2002]. Ces quatre glycosylases sont monofonctionnelles.

TDG et MBD4 sont des enzymes spécifiques des mésappariements et ainsi fonctionnent majoritairement sur de l’ADN double brin. TDG excise l’uracile et la thymine lorsqu’elles sont mésappariées à une guanine et également d’autres substrats tels que la 5-fluorouracile (5-FU), lésion qui peut être générée lors d’une exposition à l’agent anticancéreux portant le même nom. MBD4, quant à elle, possède un spectre de réparation similaire à celui de TDG (tableau (1.3)). Enfin, UNG et SMUG1, fonctionnent toutes les deux à la fois sur de l’ADN simple et double brin.

Substrat	UNG	SMUG1	TDG	MBD4
T :G	Non	Non	Oui	Oui
U (ADN simple-brin)	Oui	Oui	Non	Non
U (ADN double-brin)	Oui	Oui	Oui	Oui
5hmeU (ADN simple-brin)	Non	Oui	Non	Non
5hmeU (ADN double-brin)	Non	Oui	Oui	Non ?
ϵ C (ADN simple-brin)	Non	Oui	Non	Non ?
ϵ C (ADN double-brin)	Non	Oui	Oui	Oui (Faible)
5-FU (ADN simple-brin)	Oui	Oui	Oui	Non
5-FU (ADN double-brin)	Oui	Oui	Oui	Oui

Tableau 1.3 – Principaux substrats des enzymes impliquées dans la réparation de l’uracile, d’après [Krokan *et al.*, 2002].

Nous avons vu qu’il existait deux modes d’incorporation de la base uracile dans l’ADN qui peut être en appariement avec une guanine (voie de la désamination de la cytosine) ou avec une adénine (voie de la mauvaise incorporation de dUMP). Il a été montré que la base uracile, lorsqu’elle est appariée à une adénine ou à une guanine, était essentiellement excisée par UNG

et SMUG1 [Kavli *et al.*, 2002]. Selon l'appariement de l'uracile, le mécanisme de réparation ne sera pas le même. UNG est néanmoins l'enzyme majoritairement impliquée dans la réparation de cette lésion, c'est pourquoi nous allons nous focaliser sur elle [Kavli *et al.*, 2002].

UNG se trouve chez l'homme sous une forme mitochondriale (UNG1) et une forme nucléaire (UNG2) qui diffèrent uniquement dans leurs séquences N-terminales. Il a été montré qu'une fraction d'UNG2 s'accumulait au niveau des foyers de réplication durant la phase S du cycle cellulaire [Kavli *et al.*, 2002].

Cette glycosylase est capable de réparer la base uracile dans l'ADN double et simple brin. Ainsi, si une cytosine est désaminée en uracile dans l'ADN simple brin au niveau de la fourche de réplication, celle-ci est excisée par UNG2. Puisque l'AP-endonucléase reconnaît principalement les sites abasiques dans de l'ADN double-brin, Kavli *et al.* ont proposé des voies alternatives pour la suite du processus. Une fois l'uracile excisée, UNG2 se retire du site abasique. Deux mécanismes sont alors possibles pour poursuivre la réparation, l'un faisant appel à une régression de la fourche de réplication et l'autre mettant en jeu le mécanisme de recombinaison qui utilise alors la chromatide soeur [Kavli *et al.*, 2002]. Une autre alternative est que le site abasique soit franchi ("bypassed") par la voie de la synthèse translésionnelle.

En revanche, si l'uracile est incorporée durant la réplication, formant ainsi une paire U : A, il semble que la réparation soit principalement assurée par la voie du "long patch repair" de la BER, initiée par UNG2.

Dans le cas où la base uracile est produite par désamination de la cytosine au sein de l'ADN simple brin, celle-ci est réparée par la voie du "short-patch repair" de la BER, initiée par UNG2 ou SMUG1, ou dans une faible mesure par TDG ou MBD4. Il apparaît que TDG et MBD4 fonctionnent principalement dans des contextes "CpG", tandis que UNG2 et SMUG1 peuvent fonctionner dans tous les contextes avec néanmoins des efficacités variables (moins d'activité d'UNG2 dans les régions riches en GC) [Krokan *et al.*, 2002].

UNG2 semble initier préférentiellement la réparation de l'uracile dans l'ADN en réplication, tandis que SMUG1 semble impliquée davantage en dehors de la phase de réplication [Pettersen *et al.*, 2007].

Concernant UNG2, il a été démontré que son activité était stimulée en présence de Mg^{2+} . Certaines glycosylases mono-fonctionnelles sont également stimulées par la présence d'Ape1. Dans ce cas précis, l'ajout d'Ape1, en absence de Mg^{2+} , n'augmente que faiblement l'activité d'excision de l'uracile initiée par UNG2 dans l'appariement U : A [Pettersen *et al.*, 2007, Kavli *et al.*, 2002]. Néanmoins, en présence de Mg^{2+} , Ape1 semble stimuler l'excision de l'uracile (U : A).

L'existence de la glycosylase SMUG1 a été mise en évidence par Haushalter *et al.* en 1999 chez *Xenopus*. Ils ont trouvé que cette enzyme possédait une forte activité pour l'ADN simple brin, c'est pourquoi ils ont choisi de nommer cette nouvelle protéine "single-strand selective monofunctional uracil-DNA glycosylase" (SMUG1). Ceci leur a permis d'identifier une protéine homologue chez l'homme : hSMUG1. Des expériences menées sur des cellules HeLa ont permis de localiser cette protéine dans le noyau mais également dans le cytoplasme [Kavli *et al.*, 2002]. Contrairement à UNG, cette enzyme a été observée, dans le noyau, au sein du nucléole.

Il a été montré que SMUG1 pouvait exciser l'uracile dans de l'ADN simple brin ou appariée à une adénine ou une guanine [Kavli *et al.*, 2002, Haushalter *et al.*, 1999, Nilsen *et al.*, 2001]. Il est également suggéré que SMUG1 est fortement impliquée dans la réparation des lésions

oxydatives de la thymine ou de la cytosine, notamment la 5-hydroxyméthyluracile (5-hmeU, issue de l'oxydation de la thymine ou de l'oxydation suivie de la désamination de la cytosine) [An *et al.*, 2005, Krokan *et al.*, 2002]. Une étude réalisée sur des cellules MEF (mouse embryo fibroblast) de souris UNG^{+/+} a montré que l'inhibition de l'UNG par un inhibiteur spécifique (Uracile glycosylase inhibitor, Ugi) conduisait à une très forte diminution de l'excision de l'uracile en appariement U : A. De plus, ils ont observé qu'en combinant l'ajout de Ugi et d'un anticorps ciblant mSMUG1 (SMUG1 de souris) cela conduisait à une inhibition quasi-totale de l'excision de l'uracile en appariement U : A [Nilsen *et al.*, 2001]. Lorsque cette fois ils ont incubé une faible concentration d'un oligonucléotide double brin contenant un mésappariement U : G avec un extrait UNG^{-/-}, ils ont trouvé que mSMUG1 contribuait majoritairement à l'excision de l'uracile.

SMUG1 se lie fortement au site abasique qu'elle génère et son activité est stimulée par la présence d'Ape1 en présence de Mg²⁺ [Kavli *et al.*, 2002, Pettersen *et al.*, 2007].

L'implication exacte de ces glycosylases (UNG, SMUG1, TDG et MBD4) dans la réparation de l'uracile n'est cependant pas entièrement élucidée et de nombreuses études réalisées dans des conditions différentes proposent des conclusions divergentes. Un modèle global pour la réparation de l'uracile et la 5-hydroxyméthyluracile a été proposé rassemblant les quatre glycosylases selon la localisation de la lésion (figure (1.18)).

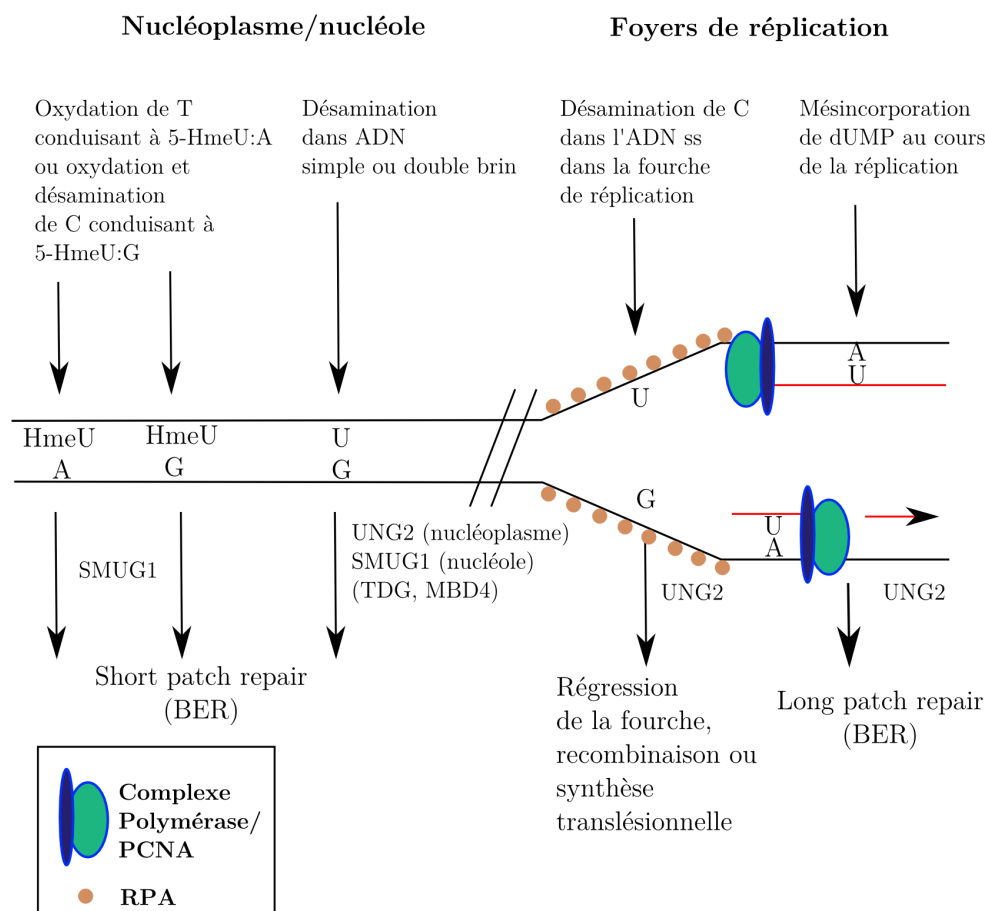


Figure 1.18 – Modèle unifié de la réparation de l'uracile et de la 5-hydroxyméthyluracile dans l'ADN, d'après [Kavli *et al.*, 2002].

1.5.2.2 La 8-oxoguanine glycosylase humaine (OGG1) et son homologue bactérien la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase (Fpg)

La 8-oxoguanine (8-oxoG) est la lésion oxydative majoritairement formée au sein de l'ADN. Celle-ci peut se trouver appariée à une cytosine, lorsque l'oxydation s'est produite sur de l'ADN double brin non muté. Elle peut également être appariée à une adénine par incorporation de 8-oxodGTP ou encore lorsque la 8-oxoG, appariée à une cytosine, est répliquée (voir paragraphe "Les oxydations" page 10).

Plusieurs enzymes sont en charge de limiter la présence de 8-oxoG. Ce système, connu sous le nom de système "GO", fait intervenir trois enzymes : MutT, MutY et Fpg chez la bactérie, MHT, MYH et OGG1 chez l'homme [Lu *et al.*, 2001]. MutT chez la bactérie et MHT chez l'homme ont pour rôle d'éliminer la présence de 8-oxodGTP dans le pool de nucléotides par hydrolyse de ce nucléoside triphosphate. Les glycosylases MutY (chez la bactérie) et MYH (chez l'homme), excisent la base adénine lorsque celle-ci est appariée à la 8-oxoG, ce qui permet d'éviter les transversions que ce mésappariement peut générer. Enfin, les glycosylase Fpg (chez la bactérie) et OGG1 (chez l'homme) réparent la 8-oxoG, ainsi que d'autres lésions oxydatives, en appariement avec une cytosine [Ide et Kotera, 2004, Lu *et al.*, 2001].

La Formamidopyrimidine ADN glycosylase, Fpg, également nommée MutM, est une métalloprotéine de 30 kDa qui possède un motif de doigt de zinc sur sa partie C-terminale [Chetsanga *et al.*, 1981, Castaing *et al.*, 1993]. Celle-ci est présente à la fois dans le noyau et dans les mitochondries [Ide et Kotera, 2004]. Cette glycosylase est bi-fonctionnelle et son activité AP-lyase fait intervenir un mécanisme de β,δ -élimination. Elle est en charge de la réparation de certaines bases oxydées comme la 8-oxoG [Lu *et al.*, 2001]. Il est à noter que la réparation de la 8-oxoG par cette enzyme n'est effective que lorsque cette base est appariée à une cytosine ou encore à une thymine. En effet, la 8-oxoG n'est pas réparée lorsqu'elle est appariée à une adénine ou une guanine [Castaing *et al.*, 1993]. Elle répare également la base FapyG, ce qui lui doit d'ailleurs son nom [Chetsanga *et al.*, 1981]. D'autres bases oxydées, comme la FapyA, la 5-hydroxyuracile ou encore la 8-oxoA sont substrats pour cette enzyme [Robertson *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2007]. Cette enzyme partage des homologies de séquence avec la glycosylase bactérienne EndoVIII [Ide et Kotera, 2004, Lu *et al.*, 2001].

La reconnaissance de la lésion 8-oxoG par Fpg repose sur l'état de protonation de l'atome N⁷ de la guanine [Fromme et Verdine, 2003, Fromme *et al.*, 2004]. Fpg discrimine la base en face de laquelle se trouve la lésion en la reconnaissant par l'intermédiaire d'un de ses résidus arginine, et conserve cette base dans son site actif au cours de la réaction [Fromme *et al.*, 2004].

Chez l'homme, c'est la glycosylase OGG1 qui répare les lésions 8-oxoG, 8-oxoA ainsi que la FapyG. Il existe chez l'homme deux variants provenant du même gène, différant dans leurs parties C-terminales [Bruner *et al.*, 2000]. Le premier variant, α -OGG1, est une protéine de 39 kDa présente dans le noyau des cellules. Le second, β -OGG1, localisé dans les mitochondries, est une protéine de 47 kDa. La glycosylase OGG1, tout comme Fpg, est bi-fonctionnelle, mais son mécanisme AP-lyase fait intervenir cette fois une β -élimination.

La découverte de cette enzyme chez l'homme, simultanément dans plusieurs laboratoires, fait suite à sa découverte chez la levure *S. Cerevisiae* du fait de leur homologie [Bjelland et Seeberg, 2003, Radicella *et al.*, 1997].

Bien que réparant des lésions similaires à la Fpg, OGG1 possède une structure très différente de celle de la Fpg. Sa structure proche des enzymes d'*E. coli* EndoIII ou encore de MutY et appartient à la super-famille de EndoIII [Lu *et al.*, 2001]. La structure cristallographique de la glycosylase OGG1, complexée à un oligonucléotide contenant la lésion 8-oxoG, est illustrée sur la figure (1.19).

Tout comme pour la Fpg, la reconnaissance de la 8-oxoG par OGG1 se fait par l'intermédiaire de l'état de protonation de l'atome N⁷ de la guanine [Bruner *et al.*, 2000]. La réparation de la lésion 8-oxoG est, tout comme pour Fpg, discriminante de la base à laquelle elle est appariée. Le site actif de OGG1 est composé de deux poches : la première s'occupant de la lésion et la seconde de la base cytosine à laquelle elle fait face. Cette deuxième poche est très importante car elle permet de distinguer l'oxydation de la guanine appariée à une cytosine, de la mauvaise incorporation de 8-oxodGTP, présent dans le pool de nucléotide, en face d'une adénine [Ide et Kotera, 2004]. Lorsque la glycosylase reconnaît le nucléotide endommagé celui-ci est sorti de la double hélice et intégré dans une poche spécifique du site actif de l'enzyme. L'espace généré dans l'ADN est alors comblé par un résidu asparagine [Bruner *et al.*, 2000]. Une fois la base excisée par OGG1, la base libre est conservée par l'enzyme et sert de cofacteur pour l'étape suivante (activité AP-lyase) [Fromme *et al.*, 2003].

Il est à noter qu'un stress oxydant ne semble pas induire l'expression de la protéine OGG1 [Fortini *et al.*, 2003, Mirbahai *et al.*, 2010]. De plus, son expression ne semble pas varier au cours du cycle cellulaire. Alors qu'à l'état basal la forme nucléaire de OGG1 est distribuée de manière homogène dans le noyau, il a été montré qu'après un stress UVA, générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS), OGG1, tout comme Ape1, est recrutée au niveau de foyers nucléaires dans des régions inter-chromatiniennes ("nuclear speckles") [Campalans *et al.*, 2007]. De plus, la relocalisation de OGG1 après un stress aux UVA semble associée, non pas à la présence des dommages oxydatifs, mais à la très forte augmentation de ROS autres que le peroxyde d'hydrogène et les superoxydes.

Il est connu que OGG1 possède une forte affinité pour les sites abasiques et que son activité AP-lyase est beaucoup plus faible que son activité glycosylase. OGG1 est stimulée par Ape1 qui l'empêche de se réassocier au produit d'excision de la base endommagée [Hill *et al.*, 2001]. Il semble même que dans des conditions où Ape1 est présente en grande quantité, celle-ci réalise la coupure du lien phosphodiester à la place de OGG1 [Vidal *et al.*, 2001].

Des modèles de souris déficientes pour OGG1 ont été créés. Bien que celles-ci soient d'apparence physique normale, il a été observé une accumulation de lésions 8-oxoG dans leurs hépatocytes primaires reliée à leurs âges [Klungland et Bjelland, 2007].

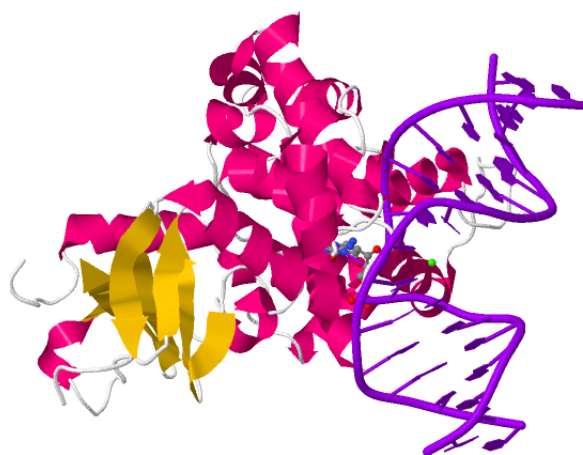


Figure 1.19 – Structure cristallographique de la protéine humaine OGG1 complexée avec un oligonucléotide contenant une 8-oxoG (numéro PDB : 1EBM).

1.5.2.3 L'AP-endonucléase humaine, Ape1

Les apurique/apyrimidique-endonucléases (AP-endonucléases) de classe II sont regroupées en deux familles de protéines selon leur homologie avec les enzymes d'*E. coli* exonucléase III (ExoIII) et endonucléase IV (EndoIV). Ape1 est l'AP-endonucléase majoritaire chez l'homme (95 % de l'activité AP-endonucléase totale) et l'homologue humain de ExoIII [Sharma et Dianov, 2007, Wilson et Barsky, 2001, Abbotts et Madhusudan, 2010].

Ape1, aussi connue sous le nom de Ref1, hApe, ApeX ou encore hAp1, est à la fois une endonucléase en charge de la réparation des sites abasiques et un facteur redox impliqué dans la régulation des gènes.

Il s'agit d'une protéine nucléaire d'environ 35 kDa, dont le gène est composé de quatre introns et cinq exons. Cette protéine se retrouve également dans le cytoplasme, ce qui est attribué à la réparation de l'ADN mitochondrial et à ses autres fonctions (fonction redox) [Evans *et al.*, 2000, Abbotts et Madhusudan, 2010]. L'expression de la protéine Ape1 dépend de la phase du cycle cellulaire et est maximale en début ou milieu de phase S [Abbotts et Madhusudan, 2010]. Dans les cellules humaines, cette protéine est produite en grande quantité (350000-7000000 molécules par cellule) [Marenstein *et al.*, 2004]. Il a été suggéré que l'expression de Ape1 pouvait s'auto-réguler par fixation de cette protéine sur le promoteur de son propre gène, inhibant ainsi sa transcription [Evans *et al.*, 2000]. Il est à noter que l'expression de son gène est inductible et qu'elle est augmentée lors d'un stress oxydatif. Il n'est néanmoins pas encore établi si cette propriété est due à son rôle dans la réparation de l'ADN ou bien à son activité de régulateur transcriptionnel.

Il apparaît que Ape1 est une protéine essentielle pour la croissance et la survie cellulaire, notamment du fait de sa fonction liée à la réparation de l'ADN. Il a été montré que des souris hétérozygotes mutées pour le gène Ape1 mourraient au cours du développement embryonnaire [Xanthoudakis *et al.*, 1996]. La sous-régulation de cette enzyme conduit à l'accumulation de sites

abasiques toxiques qui peuvent induire l'apoptose. Fung *et al.* ont supprimé l'expression de la protéine Ape1 dans plusieurs types de cellules humaines, par la technique des siRNA, et ont constaté un arrêt de la prolifération cellulaire et l'activation de l'apoptose. L'expression dans ces cellules de la protéine de levure Apn1, capable de réparer de manière similaire à Ape1 les sites abasiques, a supprimé ces effets. Apn1 étant dépourvue d'activité redox, ils en ont déduit que l'activité AP-endonucléase d'Ape1 était essentielle pour la survie cellulaire [Fung et Demple, 2005].

Il a également été montré qu'une déficience en Ape1 augmentait la sensibilité à certains stress alkylants et oxydants [Wilson et Barsky, 2001]. A l'inverse la surexpression d'Ape1 dans des cellules possédant initialement un niveau normal en cette protéine, ne conduit pas de manière systématique à une protection envers ces mêmes stress [Evans *et al.*, 2000].

Cette AP-endonucléase, ou plus précisément son domaine C-terminal, hydrolyse le lien phosphodiester directement en 5' d'un site abasique générant une cassure simple brin 3'-OH et 5'-dRP (figure (1.20)). Cette activité a été montrée comme étant dépendante de la concentration en cation métallique divalent (Mg^{2+} , Zn^{2+}) [Wilson *et al.*, 1997, Wilson et Barsky, 2001]. Ce cation métallique semble intervenir non pas dans l'étape de la formation du complexe enzyme-ADN, mais dans l'étape de coupure [Wilson et Barsky, 2001]. Bien que décrite comme agissant sur des sites abasiques dans l'ADN double brin, il a été récemment prouvé qu'elle avait également une activité AP-endonucléase sur de l'ADN simple brin [Marenstein *et al.*, 2004]. Son activité sur l'ADN simple brin est néanmoins 20 fois inférieure à celle sur de l'ADN double brin [Dyrkheeva *et al.*, 2007]. Ape1 a besoin, pour son action AP-endonucléase, d'au moins 5 nucléotides en 5' de la lésion et de 3 nucléotides en 3' de la lésion [Wilson *et al.*, 1995]. Certaines mutations dans la séquence d'acides aminés de cette enzyme (Leu104Arg¹³, Glu126Asp, Arg237Ala/Cys et Aspn283Gly) induisent une diminution de 40 % à 90 % de son activité [Wilson et Barsky, 2001].

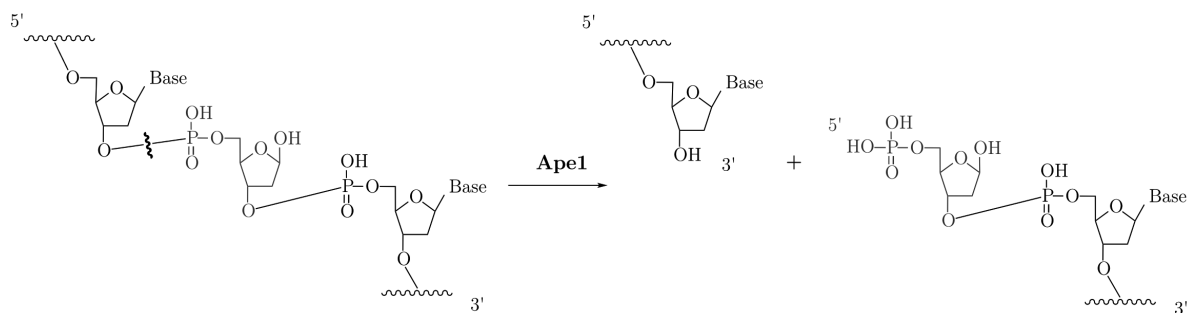


Figure 1.20 – Mécanisme d'incision d'un site abasique par l'AP-endonucléase humaine.

Cette protéine interagit avec d'autres enzymes de la BER. Il a été proposé qu'elle aide à la dissociation de certaines glycosylases du site abasique formant un complexe plus stable avec celui-ci [Marenstein *et al.*, 2004]. Nous avons vu qu'elle avait un effet stimulant sur les glycosylases UNG et SMUG1 en présence de Mg^{2+} . La glycosylase TDG interagit physiquement avec Ape1 ce qui augmente la capacité de TDG à exciser son substrat [Almeida et Sobol, 2007]. Ape1 aide également à la dissociation de la glycosylase bi-fonctionnelle NTH1 sur le site AP qu'elle génère. Il se pourrait que dans des conditions physiologiques, c'est à dire en forte concentration d'Ape1, NTH1 agisse comme une glycosylase mono-fonctionnelle [Almeida et Sobol, 2007,

¹³Leu104Arg correspond à la mutation de l'acide aminé leucine, en position 104 dans la séquence protéique, en arginine.

Marenstein *et al.*, 2003]. De manière similaire, elle peut déplacer OGG1 du site AP que celle-ci produit, augmentant ainsi le “turnover” de cette glycosylase [Hill *et al.*, 2001]. De plus, elle semble intervenir dans les étapes suivantes de la BER. En effet, Ape1 facilite la liaison de pol β sur le site AP non coupé et stimule son activité lyase [Marenstein *et al.*, 2004].

Nous avons vu que cette enzyme est impliquée dans la BER mais elle est également un élément essentiel de la réparation par incision de nucléotides qui est une voie alternative pour certaines lésions oxydées [Ischenko et Saparbaev, 2002] (voir paragraphe 1.5.1 page 27). Les conditions optimales pour cette activité sont néanmoins très différentes de celles pour son activité d’AP-endonucléase. En effet, celle-ci se produit à des pH plus acides (pH 6,4-6,8 contre pH 7,8-8,2) et diminue pour des concentrations salines élevées ($\text{KCl} > 50 \text{ mM}$) [Dyrkheeva *et al.*, 2007]. Sa participation au NIR semble faire intervenir des régions de sa séquence protéique différentes de celles impliquées dans son activité AP-endonucléase et utiliser d’autres mécanismes [Dyrkheeva *et al.*, 2007].

Cette enzyme possède d’autres activités comme une activité de 3’-phosphodiesterase pour le nettoyage des extrémités 3’ autres qu’un hydroxyle. Elle intervient ainsi dans la réparation des cassures simple brin de l’ADN générées par des agents tels que la bléomycine ou encore après réparation d’une base lésée par une glycosylase bi-fonctionnelle [Wilson et Bohr, 2007, Abbotts et Madhusudan, 2010, Caldecott, 2008]. D’autres activités plus faibles lui sont connues telles qu’une activité 3’-phosphatase ou 3’-5’ exonucléase. Il a été montré que l’activité exonucléase de cette enzyme dépend de la concentration en sel monovalent, avec une meilleure efficacité à faible concentration ($< 25 \text{ mM}$) tandis que sa fonction endonucléase est, elle, maximale à des concentrations salines plus élevées [Dyrkheeva *et al.*, 2007]. Cette enzyme est également capable d’enlever un nucléotide mésapparié en 3’ d’un double brin d’ADN [Chou et Cheng, 2003, Chou et Cheng, 2002].

Parallèlement à ses activités en lien avec la réparation de l’ADN, Ape1 possède une fonction de régulateur redox (domaine proche de l’extrémité N-terminale de la protéine). Cette protéine active de nombreux facteurs de transcription et facilite leur liaison à l’ADN via la réduction d’un résidu cystéine [Evans *et al.*, 2000]. Elle semble notamment être impliquée dans l’induction de l’apoptose via p53 [Evans *et al.*, 2000].

Récemment, une autre AP-endonucléase humaine homologue de ExoIII, Ape2, différant de la séquence protéique d’Ape1 aux extrémités N-terminale et C-terminale, a été découverte dont la fonction est encore peu connue [Wilson et Barsky, 2001, Abbotts et Madhusudan, 2010]. Ape2 possède une faible activité AP-endonucléase mais une plus importante activité 3’-5’-exonucléase [Sharma et Dianov, 2007, Dyrkheeva *et al.*, 2007].

1.5.2.4 L’alkyladénine glycosylase, Aag

L’alkyladénine glycosylase, connue sous le nom de Aag, MPG ou encore ANPG, est une glycosylase mono-fonctionnelle. Cette protéine nucléaire de 32 kDa possède deux isoformes chez l’homme. La glycosylase Aag mammifère partage certaines similitudes de séquence avec la 3-méthyladénine glycosylase de *Bacillus subtilis* et *Arabidopsis thaliana* [Sedgwick *et al.*, 2007].

Les substrats reconnus par cette glycosylase bien que de natures variées, concernent des modifications des bases puriques [Lee *et al.*, 2009, O’Brien et Ellenberger, 2004]. Parmi ces lésions,

on retrouve les lésions alkylées N⁷-méthylguanine et N³-méthyladénine ainsi que d'autres bases modifiées telles que l'hypoxanthine et certaines éthénobases [Robertson *et al.*, 2009, Saparbaev et Laval, 1994]. L'hypoxanthine est la base issue de la désamination de l'adénine tandis les éthénobases sont formées suite au processus de peroxydation lipidique ou encore après exposition au chlorure de vinyle [Drabløs *et al.*, 2004]. Il a été montré que l'hypoxanthine était préférentiellement excisée par Aag lorsqu'elle est appariée à une thymine ou une guanine [Saparbaev et Laval, 1994]. L'activité de cette glycosylase a tout d'abord été mise en évidence sur de l'ADN double brin. Il semble néanmoins qu'elle soit capable d'exciser les bases N⁶-éthénoadénine (ϵ A) et hypoxanthine dans l'ADN simple brin avec une efficacité plus faible [Lee *et al.*, 2009]. Il a récemment été proposé que cette glycosylase, excisant avec une efficacité décroissante l'hypoxanthine puis la N⁶-éthénoadénine puis de la N³-méthyladénine, aurait pour fonction première de réparer l'hypoxanthine et non les lésions purines alkylées [O'Brien et Ellenberger, 2004]. Les auteurs de cette étude proposent que la réparation de la lésion N⁷-méthylguanine, majoritairement formée après un stress alkylant, n'est pas intéressante d'un point de vue biologique puisque celle-ci n'est pas mutagène au contraire de la lésion N³-méthyladénine, qui est très cytotoxique, et pour laquelle l'Aag montre une très forte préférence par rapport à la base non-lésée [O'Brien et Ellenberger, 2004].

Alors que chez l'homme il semble qu'une seule enzyme, Aag, excise la lésion N³-méthyladénine, il apparaît que certaines bactéries contiennent plusieurs enzymes capables d'exciser cette base [Sedgwick *et al.*, 2007].

Aag sonde l'ADN à la recherche d'une lésion par insertion d'un de ces résidus aromatiques dans la double hélice [Sedgwick *et al.*, 2007]. Une fois la base lésée reconnue, l'enzyme l'extraît et l'insert dans son site actif. Lors de la réparation des bases neutres comme l'hypoxanthine, Aag protone d'abord cette base afin de permettre une catalyse acide [Sedgwick *et al.*, 2007]. Aag est capable de se lier aux bases pyrimidiques mais ne les excise pas [O'Brien et Ellenberger, 2003]. En effet, il semble que la catalyse acide utilisée par Aag pour l'excision de la base endommagée permette la discrimination entre les bases puriques et les pyrimidiques [O'Brien et Ellenberger, 2003]. Ceci est dû au fait que les bases puriques peuvent facilement être protonées alors que la protonation des pyrimidines est plus difficile [O'Brien et Ellenberger, 2003].

Nous avons vu que Aag répare des dérivés des bases puriques. Elle possède également une faible activité, beaucoup plus lente, pour les purines mésappariées [O'Brien et Ellenberger, 2004]. Il semble que Aag ait une efficacité d'excision inversement proportionnelle à la stabilité de l'appariement qu'elle reconnaît. A titre d'exemple, elle a une activité 50 fois supérieure pour la lésion N⁷-méthylguanine appariée à une thymine que lorsque celle-ci est appariée à une cytosine. La discrimination avec l'adénine non modifiée se fait par l'intermédiaire du résidu histidine-136. En effet ce résidu interagit avec les bases éthénoadénine et hypoxanthine, par liaison hydrogène, ce qui n'est pas le cas pour l'adénine. Il semble que la discrimination de la guanine non-lésée soit due à un clash stérique entre le résidu asparagine-169 de la protéine et l'amine exocyclique de la guanine. Il a ainsi été montré que la mutation de cet acide aminé (Asn-169) en sérine ou en alanine, augmentait l'activité de Aag envers la guanine non-lésée [O'Brien et Ellenberger, 2004].

Des études ont également été menées sur l'effet de la protéine Ape1 sur l'activité de cette glycosylase. Ainsi, il a été montré que Ape1 ne stimule pas la catalyse d'excision de la base

endommagée par Aag sous des conditions de “single turnover”, c’est à dire en excès d’enzyme, alors qu’elle semble avoir un effet dans des conditions de “multiple turnover” (excès de substrat par rapport à l’enzyme) [Maher *et al.*, 2007, Baldwin et O’Brien, 2009]. La coordination de l’activité d’excision de la base par Aag et celle d’incision du site abasique par Ape1 est proposée comme provenant du fait de leurs différentes cinétiques. En effet, il apparaît que la coupure du site abasique par Ape1 est beaucoup plus rapide que l’excision de la base par Aag. Ceci permet que les sites abasiques ne soient pas accumulés [Maher *et al.*, 2007].

Il a été montré que l’enzyme Aag est très vite inactivée à faible force ionique. L’ajout de protéine dans le tampon de cette enzyme la stabilise. Baldwin *et al.* ont ainsi observé que l’ajout de 0,1 mg/mL de BSA permettait de la conserver active plusieurs heures, et ceci aussi bien à concentration en NaCl faible (42 mM) qu’élevée (120 mM) [Baldwin et O’Brien, 2009].

Nous avons vu que Aag est responsable de la réparation des adduits alkylés majoritairement formés après un stress alkylant. Ainsi de nombreuses études ont porté sur le lien entre l’expression de cette glycosylase et la sensibilité des cellules aux agents alkylants. Les études ainsi menées sont assez controversées [Drabløs *et al.*, 2004]. Certaines montrent qu’une surexpression de cette protéine est corrélée avec une résistance aux agents alkylants et d’autres établissent l’inverse [Calléja *et al.*, 1999, Trivedi *et al.*, 2005, Trivedi *et al.*, 2008]. De même la déficience en cette enzyme a parfois été reliée à une résistance ou à une sensibilité à certains agents alkylants [Roth et Samson, 2002, Engelward *et al.*, 1997].

Il semble donc que le lien entre la sensibilité ou la résistance aux agents alkylants et cette glycosylase ne soit pas complètement établi et que cela dépende à la fois du type cellulaire et de l’agent alkylant utilisé [Drabløs *et al.*, 2004] (voir également paragraphe 1.7.1.1 page 41). Cette glycosylase étant impliquée dans la première étape de la voie de réparation de la BER, il semble que la réponse à ces traitements dépende également des protéines intervenant dans la suite du mécanisme de réparation. Ainsi, Trivedi *et al.* ont montré que la surexpression seule de cette glycosylase sensibilisait des cellules MEF au TMZ (témozolomide) mais que la surexpression conjointe de la polymérase pol β rétablissait la résistance des cellules à cet agent méthylant [Trivedi *et al.*, 2008]. De plus, les lésions induites par les agents alkylants ne sont pas toutes réparées par l’intermédiaire de Aag ce qui rend les interprétations parfois délicates (voir section 1.6).

1.6 La réparation par réversion (RR)

Chez l’homme la réparation par réversion concerne uniquement certaines bases alkylées de l’ADN. Il existe trois grandes familles de protéines capables de réparer par réversion les adduits alkylés de l’ADN : la protéine Ada d’*E. coli*, la famille des O⁶-alkylguanine transférases et celle des AlkB.

La protéine d’*E. coli* Ada possède un domaine N-terminal capable de réparer la méthylation du lien phosphate méthylé (méthylphosphotriester). Pour cela, elle transfère le groupement méthyle sur un de ces résidus cystéines (Cys38) de manière irréversible. Aucun équivalent n’a été, à ce jour, trouvé chez les eucaryotes. Le domaine C-terminal de cette même protéine peut, quant à lui, réparer les adduits alkylés en position O⁶ de la guanine ainsi qu’en O⁴ de la thymine via un transfert similaire sur le résidu Cys321. La réparation de l’O⁶-alkylguanine a été clairement

démontrée uniquement lorsque celle-ci est opposée à une cytosine. Or, nous avons précédemment vu que cette lésion, bien que relativement rare, est très mutagène et que, si elle n'est pas réparée, elle peut être appariée, lors de la réplication, à une thymine [Mishina *et al.*, 2006]. Il existe une deuxième enzyme de type O⁶-alkylguanine transférase chez *E. coli* appelée Ogt réparant préférentiellement les adduits alkylés plus volumineux que le méthyle.

Chez l'homme, c'est la O⁶-alkylguanine transférase (AGT), aussi connue sous le nom de O⁶-méthylguanine-ADN méthyle transférase (MGMT), qui est responsable de la réparation des adduits peu volumineux en position O⁶ de la guanine ainsi que la méthylation en O⁴ de la thymine. Cette enzyme de 22 kDa répare également la base chloroalkylée O⁶-chloroéthylguanine formée après exposition aux agents anticancéreux chloroéthylés comme la carmustine, également appelée BCNU, ou encore la fotémustine [Drabløs *et al.*, 2004]. Contrairement à la protéine Ada, cette enzyme est capable de réparer la lésion O⁶-méthylguanine face à n'importe quelle base [Mishina *et al.*, 2006]. Elle répare la O⁶-méthylguanine mais également d'autres alkylations en position O⁶ de la guanine telles que la lésion O⁶-benzylguanine. Néanmoins sa cinétique de réaction est maximum pour le méthyle et décroît avec la taille de l'adduit [Mishina *et al.*, 2006]. De plus, la O⁶-méthylguanine est plus efficacement réversée que la O⁴-méthylthymine. La localisation de cette protéine est assez controversée puisque celle-ci a été localisée dans le noyau ou dans le cytoplasme selon les études menées [Belanich *et al.*, 1996, Ayi *et al.*, 1992, Ishibashi *et al.*, 1994]. L'explication la plus probable est que cette enzyme est présente dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau après alkylation de la cellule [Lim et Li, 1996, Kaina *et al.*, 2007].

Cette enzyme, composée de deux sous domaines, possède une structure similaire au domaine C-terminal de la protéine bactérienne Ada [Sedgwick *et al.*, 2007]. Sa partie N-terminale contient un site zinc (II). Son interaction avec l'ADN se fait principalement par contact au niveau du squelette phosphate. Une fois la base reconnue celle-ci est insérée dans le site actif de l'enzyme et un résidu arginine-128 comble le trou laissé par la base [Mishina *et al.*, 2006]. Le mode exact de reconnaissance de la base lésée n'est néanmoins pas encore complètement établi.

Une molécule de protéine MGMT reconnaît un dommage et transfère, d'une manière identique aux protéines précédemment évoquées, le groupe alkyle sur un de ses résidus cystéines (Cys145). Une fois ce transfert effectué, la MGMT devient inactive et est rapidement dégradée par la voie d'ubiquitination (figure (1.21)). Cette enzyme "suicide" semble intervenir seule dans la réparation de ces lésions et ne nécessite pas d'autres cofacteurs [Verbeek *et al.*, 2008].

Du fait de son fonctionnement, la capacité des cellules à réparer la lésion O⁶-méthylguanine dépend de la quantité initiale en MGMT ainsi que la vitesse à laquelle les cellules sont capables de synthétiser cette protéine [Kaina *et al.*, 2007].

La régulation de cette protéine se fait par méthylation de son gène. La méthylation du promoteur a pour effet une diminution de son expression, mais il semble qu'une méthylation du corps de son gène ait comme conséquence d'augmenter son expression [Margison *et al.*, 2003]. Le niveau d'expression de cette protéine semble dépendre du tissu cellulaire mais également de l'individu. De même les tissus tumoraux présentent différentes quantités de MGMT [Kaina *et al.*, 2007]. De plus, son expression semble être inductible par un stress alkylant et requiert notamment la présence du facteur de transcription p-53.

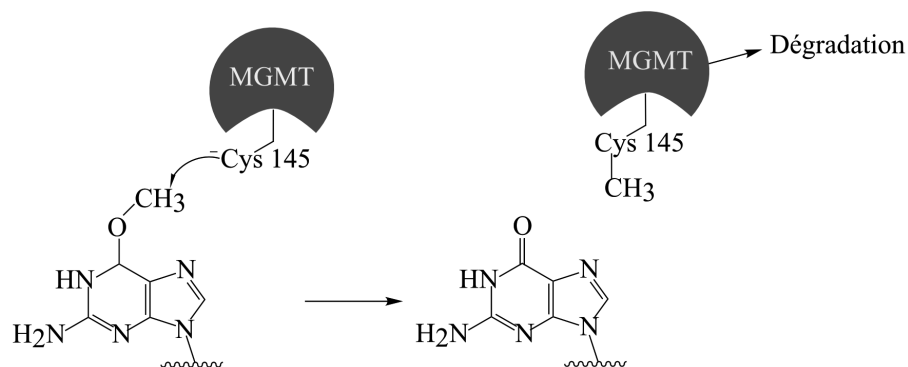


Figure 1.21 – Mécanisme de réparation par réversion par la O⁶-méthylguanine-ADN méthyle transférase humaine (MGMT).

Cette protéine est la seule impliquée dans la réparation de la lésion O⁶-méthylguanine. Cette lésion est mutagène, et semble également impliquée, tout comme la O⁶-éthylguanine, dans le phénomène de cancérogénèse pouvant se produire après une exposition à un agent alkylant. La présence de l'enzyme MGMT semble donc apporter une protection contre ces mécanismes. Il apparaît qu'elle protège également les cellules des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides qui peuvent être induits par la lésion O⁶-méthylguanine. Il est également connu que cette base alkylée peut induire l'apoptose par l'intermédiaire de la voie de réparation du MMR. Ainsi, cette enzyme apporte une protection vis-à-vis des agents méthylants, de type SN1 comme la N-méthyle-N-nitrosourée (MNU) [Kaina *et al.*, 1997]. Certains agents utilisés en chimiothérapie génèrent, entre autres, la lésion O⁶-méthylguanine ou encore O⁶-chloroéthylguanine. Leur action est en grande partie attribuée à la présence de ces lésions cytotoxiques. Dans ce cas, il semble que l'activité de cette protéine puisse limiter l'efficacité de ces traitements (voir paragraphe 1.7.2.2 page 46).

En 2002, la réversion du groupement méthyle de la 1-méthyladenine et de la 3-méthylcytosine a été démontrée pour l'enzyme AlkB d'*E. coli*. Cette dernière agit vraisemblablement via un mécanisme de désalkylation oxydative [Mishina *et al.*, 2006]. AlkB est impliquée dans la réparation des adduits alkylés de l'ADN simple brin, en particulier des lésions majoritaires 1-méthyladénine et 3-méthylcytosine [Sedgwick *et al.*, 2007]. Il a récemment été découvert une autre classe d'enzymes humaines (ABH2 et ABH3), homologues humains d'AlkB, responsables de la déméthylation de la 1-méthyladenine et de la 3-méthylcytosine [Cline et Hanawalt, 2003]. ABH2 répare préférentiellement l'ADN double brin alors que ABH3 (aussi appelée PCA-1) répare principalement l'ADN simple brin. Bien que toutes les deux réparent ces deux substrats, ABH2 est plus efficace pour la réparation de la 1-méthyladénine et ABH3 pour la 3-méthylcytosine [Sedgwick *et al.*, 2007]. De plus, celles-ci ne semblent pas localisées au même endroit dans la cellule. Ainsi en dehors de la phase S, ABH2 est concentrée dans le noyau et, au cours de la phase S, elle est localisée au niveau des fourches de réplication. ABH3, quant à elle, se trouve à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. Il a également été montré que AlkB, ainsi que ABH3, s'occupaient de la réparation des lésions méthylées de l'ARN [Sedgwick *et al.*, 2007].

Chez les plantes, les levures et certaines bactéries, les dimères de pyrimidines de type cyclobutane (CPDs) et également, dans certains cas, les photoproduits (6-4) sont également réparés par un mécanisme de réversion faisant intervenir des ADN-photolyases. Dans le cas des CPDs,

la réparation se fait sous excitation lumineuse (340-400 nm) via la coupure du cyclobutane qui relie les deux pyrimidines adjacentes [Sancar *et al.*, 2004].

1.7 Lien entre la réparation de l'ADN (BER et RR) et certaines pathologies

Nous avons déjà évoqué certaines pathologies en lien avec des déficiences du système de réparation de l'ADN par excision de nucléotides. Il existe également des évidences associant la voie de réparation de la BER à certaines pathologies. Des études ont notamment porté sur son implication dans les phénomènes de neurodégénérescence ou encore dans le vieillissement cellulaire [Martin, 2008, Xu *et al.*, 2008].

De nombreuses évidences semblent également indiquer un lien entre la réparation de l'ADN et certains cancers. La réparation de l'ADN joue, dans ce cas, un rôle ambigu. Lorsque les cellules sont saines, la présence du mécanisme efficace de réparation de l'ADN est essentiel pour maintenir leur intégrité génomique. Un défaut de ces voies de réparation peut conduire à des mutations et ainsi à l'apparition de cancers. Néanmoins, lorsque les cellules sont cancéreuses, les traitements consistent à induire la mort des cellules tumorales en limitant celle des cellules saines. De nombreux traitements anticancéreux ciblent l'ADN, si bien que la réparation de l'ADN a ici un rôle de première importance. Dans ce cas, l'objectif est d'endommager au maximum les cellules tumorales de sorte à induire la mort cellulaire. Ainsi, une réparation de l'ADN trop efficace des cellules ciblées gêne et limite l'efficacité des traitements.

Nous allons donc au cours de cette partie décrire différents liens existant entre la réparation de l'ADN et le cancer, en particulier les deux voies de réparation auxquelles nous nous intéressons : la réparation par excision de base et par réversion.

1.7.1 Liens entre la BER et le cancer

Dans un premier temps, nous allons présenter plusieurs évidences reliant le cancer et la voie de réparation de la BER. Ainsi, nous verrons que des altérations de l'expression de certaines glycosylases ont été reliées à plusieurs cancers, et que leur expression a parfois été corrélée à la réponse des cellules aux traitements anticancéreux. Nous exposerons ensuite les stratégies qui sont employées pour augmenter l'efficacité de ces traitements et qui ciblent la voie de réparation par excision de base.

1.7.1.1 La BER et son implication dans cette pathologie

Nous traiterons, tout d'abord, des liens qui ont été établis entre l'expression de plusieurs enzymes de cette voie de réparation de l'ADN et différents types de cancers. Nous verrons ensuite leurs implications dans la réponse aux traitements anticancéreux.

Expression des enzymes de la BER et le cancer

De nombreuses études ont porté sur les glycosylases OGG1 et MYH, toutes deux impliquées dans la réparation des bases oxydées de l'ADN. Rappelons que OGG1 est la glycosylase bi-fonctionnelle qui répare la lésion 8-oxoG avant que cette dernière ne soit répliquée, c'est à dire en appariement

avec une cytosine. MYH, quant à elle, est la glycosylase mono-fonctionnelle qui excise la base adénine lorsque celle-ci est appariée avec une 8-oxoG, c'est à dire après la réplication de la lésion 8-oxoG, ce qui permet à la polymérase de restaurer l'appariement 8-oxoG : C qui sera à nouveau pris en charge par OGG1.

Des mutations du gène OGG1 ont été identifiées dans des tumeurs du poumon et des reins chez l'homme. De plus, la mutation de l'acide aminé sérine 326 de cette protéine en cystéine (notée Ser326Cys) a été associée à une augmentation du risque de plusieurs cancers [Fortini *et al.*, 2003]. Al-Tassan *et al.* ont également montré un lien entre des variants de MYH et une prédisposition aux tumeurs colorectales [Al-Tassan *et al.*, 2002]. Des modèles de souris mutées pour les gènes des glycosylases OGG1 et MYH ont été développés afin d'étudier leurs conséquences. Ainsi, l'inhibition du gène OGG1 a été reliée à une prédisposition au développement de cancer du poumon chez des souris OGG1^{-/-}, âgées de 18 mois, pour lesquelles il a été constaté une accumulation de la lésion 8-oxoG [Sakumi *et al.*, 2003]. Une autre étude a, elle, établi une prédisposition plus précoce au développement de cancers du poumon et des ovaires chez des souris knockout pour les gènes OGG1 et MYH [Xie *et al.*, 2004].

Une autre étude a permis d'identifier plusieurs mutations de la glycosylase Neil1 chez des patients atteints d'un cancer gastrique, alors que celles-ci n'ont pas été rapportées chez des patients sains [Shinmura *et al.*, 2004].

Pour certains cancers (col de l'utérus, de la prostate, et de l'épithélium ovarien), il a été constaté une surexpression de l'AP-endonucléase Ape1 en comparaison avec les tissus sains. Des résultats similaires ont été observés pour les rhabdomyosarcomes chez les enfants, et les tumeurs des cellules germinales [Evans *et al.*, 2000]. Pour d'autres types de cancers, bien que l'expression en Ape1 n'était pas altérée, il a été observé une différence dans la localisation cellulaire de cette protéine en comparaison avec les tissus sains ; c'est notamment le cas pour le colon.

Expression, activité des enzymes de la BER et réponse aux traitements thérapeutiques

Un lien a été établi entre la localisation cellulaire de la protéine Ape1 et le pronostic associé à certaines tumeurs [Abbotts et Madhusudan, 2010]. Al-Attar *et al.* ont montré que la localisation nucléaire d'Ape1, chez des patientes atteintes de tumeurs aux ovaires, était corrélée avec un moins bon pronostic [Al-Attar *et al.*, 2010]. Une autre étude a également relié une chimiorésistance du cancer HNC (squamous cell head-and-neck cancer) avec une localisation nucléaire de Ape1 [Koukourakis *et al.*, 2001].

Plusieurs études semblent indiquer un lien entre l'augmentation de l'activité d'Ape1 et la chimiorésistance et radiorésistance de certaines tumeurs. Par exemple, Wang *et al.* ont récemment montré qu'une surexpression en Ape1 était directement liée à une résistance du cancer du poumon humain (human non-small cell lung cancer) au traitement de chimiothérapie utilisant du cisplatine [Wang *et al.*, 2009a]. Ils ont également montré que l'inhibition de l'expression de cette protéine par la technique des siRNA, dans une lignée cellulaire d'adénocarcinomes humains A549 augmentait l'induction de l'apoptose après un traitement au cisplatine. De nombreuses équipes de recherche ont utilisé des siRNA pour inhiber l'expression en Ape1 de différentes cellules tumorales, et ont montré que cela sensibilisait les cellules à des stress divers tels que le MMS ou l'agent antitumoral ACNU (alkylant). Des études ont également été menées sur la sensibilité de

cellules tumorales à la radiothérapie selon l'expression d'Ape1. Certains ont trouvé que la diminution de l'expression de cette protéine était liée à une radiosensibilité pour des cancers du col de l'utérus, néanmoins d'autres études n'ont pas établi de lien clair entre le niveau d'expression d'Ape1 et la sensibilité avec la radiothérapie [Evans *et al.*, 2000].

Certains agents antitumoraux sont des agents alkylants. La réparation des bases alkylées peut faire intervenir la voie du BER, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux nombreuses études portant sur la relation entre la glycosylase Aag, responsable entre autres de l'excision de bases alkylées N⁷-alkylguanine et N³-alkyladénine, et la réponse de cellules aux traitements alkylants, dont certains agents antitumoraux. Comme nous l'avons déjà évoqué, les études reliant l'expression de cette glycosylase avec la sensibilité aux agents alkylants sont assez controversées [Drabløs *et al.*, 2004]. Certains travaux ont corrélé une surexpression de cette protéine avec une augmentation de la sensibilité ou, au contraire, à la résistance, de cellules à des agents alkylants. D'autres études ont montré qu'une déficience en cette glycosylase conduisait à une hypersensibilité, ou au contraire, à une résistance.

Par exemple, une étude menée sur des cellules CHO (Chinese hamster ovary cells), a montré que la surexpression de cette glycosylase (homologue de rat), rendait ces cellules résistantes à un traitement alkylant au MMS [Calléja *et al.*, 1999]. Une autre étude a, elle, observé le fait inverse sur des cellules MEF (Mouse embryo fibroblast), surexprimant l'Aag humaine, traitées avec l'agent alkylant témozolomide, utilisé en chimiothérapie [Trivedi *et al.*, 2008, Trivedi *et al.*, 2005]. Dans ce cas, les auteurs concluent qu'une surexpression de cette glycosylase crée un déséquilibre au niveau de la voie de la BER et qu'en l'absence de surexpression de la polymérase β , cela conduit à l'accumulation d'intermédiaires toxiques [Trivedi *et al.*, 2008, Trivedi *et al.*, 2005].

Une autre étude a cette fois montré que des cellules myéloïdes progénitrices de moelle osseuse issues de souris déficientes en cette glycosylase, étaient résistantes à certains agents alkylants tels que le MMS [Roth et Samson, 2002]. A l'inverse, une étude a permis d'observer qu'une déficience en cette glycosylase sensibilisait certaines cellules à l'agent alkylant Me-Lex, connu pour induire spécifiquement la lésion 3-méthyladénine [Engelward *et al.*, 1997]. Bramson *et al.* ont, eux, montré que la surexpression seule de cette protéine dans des cellules CHO n'augmentait pas la résistance de ces cellules à l'agent antitumoral chloroalkylant, BCNU [Bramson *et al.*, 1995].

Il semble donc que le lien entre la sensibilité ou la résistance aux agents alkylants et la glycosylase Aag ne soit pas complètement établi et que cela dépende à la fois du type cellulaire et de l'agent alkylant utilisé [Drabløs *et al.*, 2004]. Cette glycosylase n'est que la première protéine impliquée dans la voie de réparation de la BER. Ainsi, il est probable que la réponse à ces agents alkylants dépende également des étapes suivantes, notamment des protéines Ape1 et pol β . De plus, les lésions induites par les agents alkylants ne sont pas toutes réparées par l'intermédiaire de Aag, ce qui rend les interprétations parfois délicates.

1.7.1.2 La BER comme cible thérapeutique anticancéreuse

L'efficacité des traitements de radiothérapie ainsi que certains traitements de chimiothérapie repose sur les conséquences cytotoxiques des dommages de l'ADN qu'ils induisent. De plus, comme nous venons de le voir, une surexpression de certains acteurs de la BER a été liée à des résistances aux traitements anticancéreux. Ainsi une stratégie consiste à combiner le

traitement classique avec un médicament inhibiteur des protéines participant à la réparation de l'ADN. Nous ne parlerons ici que des protéines intervenant dans la voie de réparation de la BER, mais ces traitements ont également pour cible d'autres voies de la réparation de l'ADN ainsi que d'autres protéines intervenant dans la réponse aux dommages de l'ADN (pour revue voir [Ljungman, 2009]).

Une cible très étudiée est la protéine PARP1, impliquée aussi bien dans la voie du “short patch repair”, du “long patch repair”, que dans la reconnaissance des cassures simple brin. De nombreuses tumeurs montrent une augmentation de son expression après certains traitements chimiothérapeutiques ciblant l'ADN. Il est ainsi envisagé d'inhiber cette protéine afin d'augmenter l'effet des traitements anticancéreux [Kinsella, 2009]. De nombreuses molécules ont été développées pour inhiber cette protéine, et certaines sont actuellement en cours d'essais cliniques [Helleday *et al.*, 2008]. Notamment des essais sont en cours, pour des inhibiteurs de PARP, en combinaison avec le témozolomide ou encore les dérivés du platine [Jagtap et Szabó, 2005]. Certains cancers présentent des déficiences dans leur mécanisme de réparation de l'ADN, c'est pourquoi certains ont voulu utiliser les inhibiteurs de la réparation comme unique traitement. C'est notamment le cas d'essais, qui ont été menés avec des inhibiteurs de PARP pour soigner des patients atteints de cancers héréditaires du sein et des ovaires. Pour ces cancers, les gènes BRCA1 ou BRCA2 sont souvent mutés, ce qui conduit à une déficience de la voie de la réparation par recombinaison homologue (ces deux protéines semblent interagir avec la protéine Rad51 qui intervient dans cette voie de la réparation, [Cromie *et al.*, 2001]) [Helleday *et al.*, 2008]. Ces cellules sont beaucoup plus sensibles aux inhibiteurs de PARP que les autres. Des cellules déficientes pour d'autres protéines de cette voie de réparation présentent également une meilleure sensibilité aux inhibiteurs de PARP, ce qui suggère que ceux-ci pourraient être utilisés pour traiter les tumeurs déficientes de cette voie de réparation [Helleday *et al.*, 2008].

D'autres molécules ont également été développées pour inhiber les polymérases. Celles-ci interviennent lors de la réplication de l'ADN et également lors de l'étape de resynthèse après excision du dommage. L'inhibition de celles-ci cible ainsi les cellules proliférantes ainsi que celles dont l'ADN est en train d'être réparé. Par exemple, des inhibiteurs de la polymérase β , qui intervient dans la BER, ont été développés et ont permis de sensibiliser des cellules tumorales à l'agent méthylant témozolomide [Ljungman, 2009].

Une des cibles prometteuses à inhiber est Ape1. En effet, comme nous avons pu le constater, cette enzyme intervient dans plusieurs processus cellulaires importants et, est vitale pour la survie et la croissance cellulaire. De part ses nombreuses fonctions dans la réparation des dommages de l'ADN (sites abasiques, bases oxydées, lésions induites par des radiations), une forte expression en Ape1 peut conduire à la diminution des effets des traitements antitumoraux [Dyrkheeva *et al.*, 2007]. Une inhibition spécifique de son activité AP-endonucléase pourrait ainsi améliorer les traitements anticancéreux. De nombreux inhibiteurs de cette protéine sont actuellement à l'étude [Ljungman, 2009, Abbotts et Madhusudan, 2010]. On peut différencier les inhibiteurs directs, qui ciblent la protéine et les inhibiteurs indirects. Dans le cas de la réparation de l'ADN, les inhibiteurs indirects de cette enzyme réagissent avec les substrats de cette enzyme, de telle sorte qu'ils ne sont plus reconnus par celle-ci.

La méthoxyamine est un exemple connu d'inhibiteur indirect de l'activité AP-endonucléase d'Ape1. Cette molécule, présentant une amine primaire, réagit avec l'aldéhyde de la forme ouverte

du site abasique obtenu après coupure de la base endommagée par la glycosylase adaptée (figure (1.22)). Ceci génère un produit qui n'est plus substrat pour l'enzyme Ape1 [Liu et Gerson, 2004]. Il y a ainsi accumulation de pseudo-sites abasiques toxiques pour les cellules.

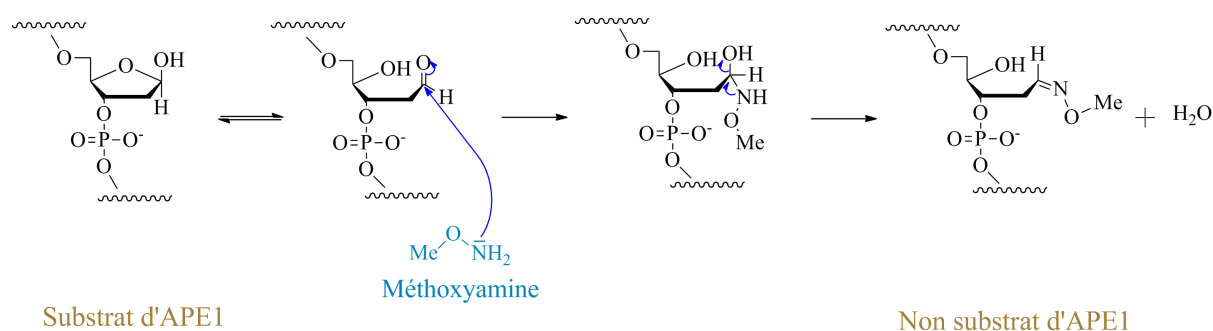


Figure 1.22 – Mécanisme de réaction de la méthoxyamine sur le site abasique.

Liu *et al.* ont montré que l'ajout de méthoxyamine augmentait l'efficacité du traitement au TMZ dans des xénogreffes de cancer humain du colon [Liu *et al.*, 2002]. Le produit de la réaction de la méthoxyamine avec le site abasique semble augmenter la cytotoxicité des agents alkylants, notamment le TMZ, en bloquant la réplication et en augmentant le nombre de cassures simple et double brin [Liu et Gerson, 2004]. De plus, ce produit semble stabiliser l'interaction de la topoisomérase TopoII avec l'ADN et conduire par ce biais à une mort cellulaire [Yan *et al.*, 2007]. Cette voie est intéressante car il apparaît que les tissus non tumoraux disposent de niveaux de TopoI et II plus faibles que les tissus cancéreux [Liu et Gerson, 2004]. La méthoxyamine est actuellement en phase I d'essai préclinique [Anthony *et al.*, 2009].

D'autres molécules inhibitrices d'Ape1 sont également à l'étude [Fishel et Kelley, 2007, Abbotts et Madhusudan, 2010]. Citons par exemple la lucanthone qui est également un inhibiteur de topoisomérases. Cette molécule permet notamment d'améliorer l'efficacité des agents alkylants MMS et TMZ. Son action bénéfique semble néanmoins être davantage reliée à son action d'inhibition de topoisomérase qu'à celle d'Ape1 [Abbotts et Madhusudan, 2010].

Comme de nombreux agents chimiothérapeutiques sont des agents alkylants, une des stratégies pour augmenter leur efficacité est d'inhiber la réparation de lésions qu'ils induisent. Des essais ont été tout d'abord réalisés sur l'inhibition de la MGMT (voir paragraphe 1.7.2.2 page suivante). D'autres essais ont également ciblé la glycosylase Aag. Certaines études ont notamment montré que l'inhibition de l'expression de la glycosylase Aag par des ARN interférents permettait de sensibiliser les cellules tumorales, dans ce cas de cellules HeLa et une lignée de carcinome ovariens, à l'agent alkylant TMZ [Sedgwick *et al.*, 2007].

1.7.2 Liens entre la réparation par réversion et le cancer

1.7.2.1 La réparation par réversion et son implication dans cette pathologie

Il est apparu que le statut MGMT de certaines tumeurs était relié à la réponse aux traitements chimiothérapeutiques alkylants tels que le TMZ ou encore la BCNU. Néanmoins, le choix du biomarqueur associé reste à l'étude. Certains travaux s'intéressent à la méthylation du promoteur du gène de cette enzyme tandis que d'autres étudient son expression. Les premières études ont été menées sur la méthylation du promoteur du gène de la MGMT. La méthylation de celui-ci

semble être associée à la réponse aux traitements chimiothérapeutiques alkylants et, ainsi, être un bon marqueur prédictif de la réponse des tumeurs à ces traitements [Stupp *et al.*, 2007]. L'explication de ce phénomène est attribuée au fait que sa méthylation inhibe l'expression de la protéine MGMT, ce qui conduit à l'accumulation de lésions toxiques O⁶-méthylguanines et induirait la mort de la tumeur [Esteller *et al.*, 2000]. Certains ont, par exemple, montré que la méthylation du promoteur de ce gène sur des gliomes humains était corrélée avec une meilleure réponse au traitement à la BCNU [Esteller *et al.*, 2000]. En effet, dans cette étude la méthylation du promoteur était notamment associée à un allongement de la durée de vie. Néanmoins, bien que ce marqueur semble intéressant, il est possible que l'effet observé ne soit pas uniquement dû à l'inactivation du gène de cette protéine mais que la méthylation du promoteur reflète une dérégulation épigénétique globale [Verbeek *et al.*, 2008]. De plus, d'autres études n'ont pas permis d'établir une telle corrélation [Brell *et al.*, 2005, Spiegler-Kreinecker *et al.*, 2010]. Ainsi, d'autres équipes de recherche se sont intéressées à l'expression de la protéine MGMT et non à celle de son gène. Brell *et al.* ont observé que l'expression de la protéine MGMT était inversement corrélée à la survie de patients atteints de gliomes anaplastiques et traités à la BCNU [Brell *et al.*, 2005]. Spiegler *et al.* ont également montré une corrélation entre l'expression de la protéine et la survie des patients atteints de glioblastomes de haut grade et traités au témozolomide [Spiegler-Kreinecker *et al.*, 2010]. Ceci amène à penser que l'expression de cette protéine serait un meilleur marqueur de pronostic que la méthylation de son gène.

L'activité de la MGMT, présente dans des mélanomes, a été corrélée avec leur résistance aux traitements alkylants TMZ et fotemustine. Dans cette étude, l'inactivation de cette protéine a permis de sensibiliser les cellules tumorales à ces traitements [Naumann *et al.*, 2009].

Notons également que la cytotoxicité de la lésion O⁶-méthylguanine est attribuée à l'intervention de la voie du MMR. En effet, si cette lésion n'est pas réparée par la MGMT, les enzymes du MMR reconnaissent le mésappariement qui apparaît après réplication de cette lésion et excisent la base thymine à laquelle la lésion O⁶-méthylguanine est mésappariée. La lésion persistant dans l'ADN, cela conduit à des cycles futiles du MMR qui finalement déclenchent la mort cellulaire. Ainsi, quelle que soit l'activité de la MGMT, les cellules déficientes pour la voie du MMR sont très résistantes aux agents méthylants [Liu et Gerson, 2006].

Il a été montré que l'expression de ABH3, enzyme impliquée dans la réparation par réversion de certaines lésions alkylées (1-méthyladénine et 3-méthylcytosine), était élevée dans des carcinomes de prostate et pourrait servir de marqueur diagnostique pour ce cancer [Konishi *et al.*, 2005]. D'autres études ont montré l'importance de ABH2 dans la réparation des lésions toxiques alkylées si bien que cette enzyme apparaît également comme une cible intéressante pour les traitements anticancéreux [Sedgwick *et al.*, 2007].

1.7.2.2 La MGMT comme cible thérapeutique anticancéreuse

Nous avons précédemment vu que certaines molécules alkylantes étaient utilisées pour le traitement des cancers (voir paragraphe "Les alkylations" page 12). L'objectif de ces traitements est d'induire le maximum de lésions afin d'endommager suffisamment les cellules cancéreuses pour que celles-ci ne survivent pas. Ainsi, la réparation de ces lésions n'est pas souhaitée. La cytotoxicité des agents alkylants est principalement attribuée à la lésion O⁶-alkylguanine, réparée par la MGMT. C'est pourquoi certains traitements, notamment dans le cas de cancers résistants,

combinent l'action de ces agents alkylants avec une molécule inhibitrice de la MGMT. Un de ces composés est la O⁶-benzylguanine. Ce composé permet d'inactiver la MGMT et il a été montré qu'il permettait l'inhibition de la croissance tumorale de certaines lignées tumorales et de modèles de xénogreffes en combinaison avec un traitement au TMZ ou à la BCNU [Verbeek *et al.*, 2008]. Ce composé a ainsi été étudié en phase clinique pour des tumeurs du cerveau, des mélanomes, des lymphomes, ou encore des cancers du colon. Néanmoins, dans des études de phase I, ce composé bien qu'inactivant la MGMT, a montré qu'il augmentait l'activité myelosuppressive de la BCNU aux doses utilisées et était moins bien toléré.

Le composé O⁶-(4-bromothynyle)guanine, aussi appelé Lomeguatrib permet d'inactiver efficacement la MGMT et inhibe la croissance tumorale pour un traitement au TMZ de cancer des ovaires, du sein ou encore de mélanomes [Verbeek *et al.*, 2008]. Ce composé est d'ailleurs en essai clinique de phase II pour le traitement de mélanomes malins métastatiques [Verbeek *et al.*, 2008]. D'autres molécules inhibitrices de la MGMT sont également en cours de développement [Rapp *et al.*, 2008, Kaina *et al.*, 2004].

Des essais ont également été réalisés sur l'inactivation du gène de la MGMT par la technique des siARN. Cette approche a permis d'augmenter *in vitro* la sensibilité à la BCNU de carcinomes nasopharyngiques humains. *In vivo* la délivrance de ces ARN interférents peut se faire grâce à des vecteurs viraux. Concernant la MGMT, il a été montré que le gène E1A d'un adénovirus inhibait efficacement le promoteur du gène de la MGMT et cette stratégie a été utilisée pour des essais cliniques sur des patients atteints de cancers "tête et cou" [Verbeek *et al.*, 2008]. Kato *et al.* ont récemment utilisé des liposomes pour délivrer des siARN ciblant la MGMT. Ils ont ainsi montré que cela permettait d'inhiber significativement l'expression de la protéine *in vivo* et que cela augmentait la sensibilité au TMZ de leur modèle de gliomes [Kato *et al.*, 2010].

Une combinaison de l'inhibition de la MGMT (par l'O⁶-benzylguanine), de la voie de la BER (par la méthoxyamine, inhibiteur indirect d'Ape1), avec un traitement à faible dose de TMZ ou de BCNU a permis d'obtenir un effet antitumoral sans toxicité annexe [Liu et Gerson, 2006]. Ceci permet d'envisager des traitements combinés qui permettraient de cibler les cellules tumorales quel que soit leur statut "MMR".

1.8 Les méthodes de détection des activités de réparation de l'ADN

Dans cette partie du manuscrit nous nous focaliserons sur les méthodes utilisées pour mesurer les activités de réparation de l'ADN de la BER. Nous distinguerons, d'une part, les méthodes permettant de mesurer les capacités de réparation intrinsèques des cellules dans des conditions "physiologiques" et, d'autre part, les méthodes de mesure *in vitro*.

1.8.1 Les méthodes "cellulaires"

Une première méthode de détection des activités de réparation de l'ADN consiste à soumettre des cellules à un stress générant les lésions que l'on souhaite étudier et à analyser les dommages de l'ADN, à différents temps après ce stress. Cela suppose d'extraire l'ADN des cellules et ensuite de le digérer enzymatiquement ou de l'hydrolyser chimiquement. L'analyse des nucléosides ou des bases nucléiques obtenus peut alors se faire par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique, UV ou à la spectrométrie de masse [Cadet *et al.*, 2003]. Un des inconvénients majeurs de ces techniques vient du fait que la préparation de l'échantillon peut générer des dommages oxydatifs artéfactuels [Cadet *et al.*, 1998]. Les protocoles ont cependant été adaptés afin de minimiser ces oxydations au cours des étapes d'extraction et de digestion [Hofer et Möller, 1998, Cadet *et al.*, 2003]. Ces techniques sont très sensibles et permettent de détecter toutes sortes de lésions ainsi que leurs cinétiques de réparation. Néanmoins, cela requiert une instrumentation spécifique coûteuse, et l'analyse quantitative des dommages nécessite l'utilisation d'un standard de la lésion à étudier, qui n'est pas toujours facile à synthétiser.

Une technique également très utilisée est la méthode des comètes [Collins, 2004]. Cette méthode a tout d'abord été utilisée pour étudier les cassures de l'ADN ainsi que les sites alcali-labiles. Le principe consiste à déposer des cellules sur un gel d'agarose, qui recouvre généralement la surface d'une lame de verre, à les lyser et à les soumettre à une électrophorèse en milieu alcalin. Cette électrophorèse permet la migration de l'ADN nucléaire des cellules lysées. Ainsi, si l'ADN est intact, il aura une structure en boucles super-enroulées et migrera de manière conjointe. Si, en revanche, des cassures de chaîne sont présentes, l'ADN perdra partiellement sa structure super-enroulée et migrera selon la forme d'une comète, d'où le nom de cette méthode (figure (1.23)). La détection nécessite l'ajout d'un agent permettant la visualisation de l'ADN, typiquement le bromure d'éthidium qui est un intercalant de l'ADN. Grâce à cette technique il est également possible de mesurer la quantité de sites alcali-labiles puisque la migration est réalisée dans des conditions alcalines ce qui a pour effet de créer une coupure de chaîne au niveau de ceux-ci. La méthode des comètes a également été appliquée à la mesure des dommages oxydatifs. Pour cela, il suffit de rajouter une étape d'incubation avec l'enzyme bi-fonctionnelle qui excise la lésion 8-oxoguanine (Fpg, ou OGG1), ce qui va permettre de créer la coupure de chaîne, nécessaire à détection, au niveau de la lésion [Sauvaigo *et al.*, 2002]. Cette méthode est ainsi applicable à la détection de nombreuses lésions de l'ADN. Elle est très utilisée pour la détection de lésions de l'ADN du fait de sa simplicité de mise en oeuvre et du peu de matériel qu'elle requiert.

La méthode des comètes permet également de mesurer des cinétiques de réparation de l'ADN. Pour cela, on étudie les cassures de chaîne, suivant la méthode que nous venons de décrire, de

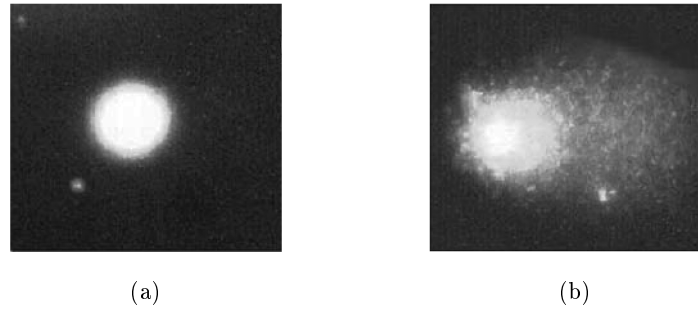


Figure 1.23 – Images d’une cellule obtenues par la méthode des comètes, dont l’ADN est intact (a) ou contient des cassures de chaîne (b).

cellules exposées à un stress et récoltées à différents temps après cette exposition.

Le protocole de cette technique a également été adapté pour mesurer la réparation de ces lésions à partir d’un extrait cellulaire [Collins, 2009]. Cela consiste à déposer sur le gel non pas les cellules dont on souhaite étudier les capacités de réparation de l’ADN, mais des cellules substrats contenant les lésions dont on souhaite mesurer la réparation (obtenues après exposition à un stress spécifique). Les lames contenant les substrats sont alors incubées avec un extrait cellulaire des cellules à étudier. Une électrophorèse est ensuite réalisée comme pour les méthodes précédemment exposées. Ainsi, si les lésions sont réparées par les enzymes présentes au sein de l’extrait cellulaire, il y aura des incisions des brins de la molécule d’ADN et ainsi formation d’une comète¹⁴.

La méthode des comètes est donc intéressante puisqu’elle permet de mesurer la réparation de l’ADN *in cellulo*, mais n’est pas spécifique d’une enzyme ou d’une lésion en particulier. Dans ce cas on étudie de manière globale un groupe de lésions générées par un stress. De plus, il est nécessaire d’être très précautionneux lors de l’utilisation de cette méthode afin de ne pas mal interpréter les cassures de chaînes observées [Azqueta *et al.*, 2009].

La technique de “host cell reactivation”, ou HCR, permet de déterminer *in cellulo* la capacité de réparation des cellules. Cette méthode repose sur la transfection d’un plasmide contenant la séquence d’un gène rapporteur codant, par exemple, pour une protéine fluorescente comme la GFP (Green Fluorescent Protein) ou induisant une réaction bio-luminescente comme c’est le cas pour la protéine luciférase. La mesure d’une activité de réparation de l’ADN par la HCR nécessite l’introduction de lésions dans la séquence de ce gène, ou de son promoteur, de sorte à n’induire une expression de la protéine fonctionnelle que lorsque les lésions sont réparées. Ainsi, il est possible d’étudier la réparation de lésions bloquantes. Dans ce cas, lorsque les lésions sont présentes la protéine n’est pas exprimée, et la réparation de celles-ci conduit à l’expression de la protéine. Il est également possible d’étudier la réparation de lésions mutagènes qui induisent des mutations de la séquence de la protéine inhibant son fonctionnement. L’introduction des lésions peut se faire par exposition du plasmide à un stress générant les lésions que l’on souhaite étudier, ou par incorporation d’un fragment d’ADN synthétique, au sein duquel la lésion a été incorporée. Cette méthode a, par exemple, été utilisée pour étudier la réparation des dommages UV. Roguev *et al.* ont ainsi utilisé deux plasmides, un “contrôle” et un lésé par une exposition aux UV, codant

¹⁴Notons que, dans ce cas, la méthode est de type “*in vitro*”. Nous avons néanmoins choisi de la faire apparaître dans cette catégorie car elle est dans le prolongement des autres méthodes comètes décrites ici.

pour deux protéines fluoresçant à des longueurs d'onde différentes [Roguev et Russev, 2000]. L'utilisation dans ce cas du plasmide contrôle permet de vérifier le fonctionnement des cellules étudiées en terme de réplication et ainsi de calibrer la mesure. Cette méthode a également été utilisée pour déterminer la réparation des dommages induits par le cisplatine ou encore pour la réparation des sites abasiques et de la lésion thymine glycol [Dabholkar *et al.*, 1992, Spivak et Hanawalt, 2006].

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir directement étudier la réparation de l'ADN au sein des cellules. L'utilisation de ce test nécessite néanmoins que la lésion étudiée induise une modification de l'expression de la protéine ou affecte sa fonctionnalité. De plus, cela requiert une transfection, ce qui peut modifier les caractéristiques de la cellule. Cette technique est également délicate à mettre en oeuvre et nécessite de nombreux contrôles. Il est, par exemple, important de vérifier le taux de transfection des plasmides afin de pouvoir comparer différentes cellules entre elles.

D'autres équipes ont récemment développé des oligonucléotides synthétiques autocomplémentaires en "épingle à cheveux", appelés "molecular beacon", au sein desquels ont été incorporées des lésions reconnues par la voie de la BER. Cette technique repose sur le fait que le duplex lésé contient un fluorophore sur un brin, et un quencheur sur l'autre (figure (1.24)). Ainsi, initialement, le quencheur est suffisamment proche du fluorophore pour qu'aucun signal ne soit émis. La structure de la molecular beacon utilisée est telle que l'excision de la lésion et l'incision du brin lors de sa réparation, conduit à éloigner le quencheur du fluorophore, qui émet alors un signal de fluorescence après excitation. La mesure de fluorescence peut être suivie par microscopie ou encore par cytométrie en flux. Ces sondes ont été transfectées dans des cellules et ont permis de détecter la réparation des lésions uracile, 8-oxoguanine, inosine, thymine glycol ainsi que d'un analogue de site abasique *in cellulo* [Maksimenko *et al.*, 2004, Matsumoto *et al.*, 2010, Mirbahai *et al.*, 2010].

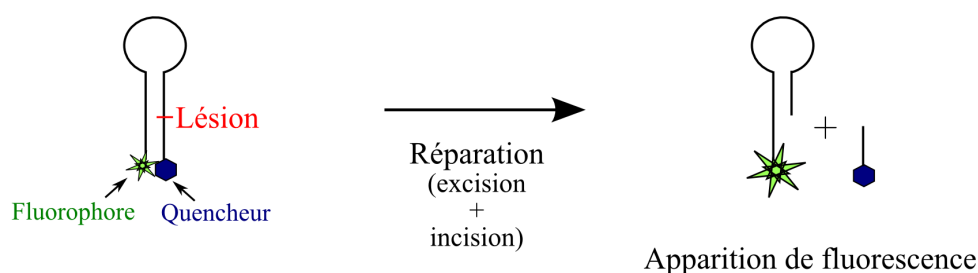


Figure 1.24 – Principe de la sonde hairpin initialement quenchée pour détecter les activités de réparation de la BER.

Néanmoins, ces sondes sont sujettes à la dégradation lorsqu'elles sont transfectées dans les cellules. Ainsi, si aucune précaution n'est prise, le signal mesuré peut être mal interprété. Cependant, la modification de ces sondes, par exemple par des liens phosphorothioates permet de limiter cette dégradation [Matsumoto *et al.*, 2010]. Il est également nécessaire, tout comme pour la méthode HCR, de vérifier le taux de transfection et d'insérer des contrôles pertinents, afin de s'assurer de la véracité des résultats observés.

1.8.2 Les méthodes *in vitro*

Une technique de détection des activités de la BER *in vitro* consiste à utiliser de l'ADN commercial, de thymus de veau par exemple, que l'on traite avec un agent radioactif générant les lésions radioactives que l'on souhaite étudier. L'ADN est alors incubé avec les enzymes d'intérêt ou un extrait cellulaire. La libération des bases endommagées, suivie par mesure de radioactivité, donne des indications sur la réparation de cette lésion. Cette méthode a notamment été appliquée pour l'étude de la réparation de l'uracile appariée à une adénine [Krokan et Wittwer, 1981, Kavli *et al.*, 2002]. L'incorporation d'uracile marquée au tritium (^3H) a été réalisée par "nick translation" d'ADN de thymus de veau en présence de dATP, dGTP, dCTP et [^3H]dUMP. L'ADN est alors incubé avec les enzymes d'intérêt, dans ce cas UNG, et l'excision de la base endommagée est suivie par des techniques chromatographiques détectant la radioactivité. Cette méthode n'est plus beaucoup utilisée pour mesurer les activités de la réparation par excision de base. Elle reste cependant très utilisée pour la mesure de l'activité de réversion de la MGMT. Cette enzyme agit par réversion sur son substrat et n'induit pas de coupure du squelette phosphate de la molécule d'ADN contrairement aux autres enzymes de la BER. Ainsi les méthodes que nous allons développer par la suite sont plus difficilement applicables, d'autant que l'activité de cette enzyme n'est pas catalytique, ce qui nécessite des méthodes très sensibles pour la détecter. Pour étudier l'activité de réversion de la MGMT par cette technique, une première étape consiste à méthyliser radioactivement l'ADN en faisant réagir un agent méthylant tritié, par exemple la [^3H]méthyle-nitrosourée [Dolan *et al.*, 1990]. La MGMT ou un extrait cellulaire est alors incubé avec cet ADN qui est ensuite hydrolysé. Les bases lésées sont alors séparées des bases normales et analysées par HPLC [Dolan *et al.*, 1990, Silber *et al.*, 1993]. Les autres techniques utilisables pour détecter cette activité enzymatique de réversion ne seront pas développées dans cette partie mais feront l'objet d'une partie introductive au cours du Chapitre 3 (paragraphe 3.2.2 page 126).

Une autre possibilité pour mesurer les activités de coupure des enzymes de la BER est d'utiliser des oligonucléotides synthétiques contenant la lésion étudiée. Le nucléotide endommagé est introduit par synthèse chimique et permet donc une parfaite connaissance du substrat que l'on étudie, contrairement au cas où l'ADN est soumis à un agent endommageant pouvant produire d'autres sous-produits que celui que l'on attend. Une méthode consiste à marquer radioactivement ces oligonucléotides lésés, classiquement avec du ^{32}P , puis à les incubés avec des enzymes de la réparation purifiées ou encore avec un extrait cellulaire, et à analyser le produit par PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide) [Fischer *et al.*, 2006, An *et al.*, 2005, Trivedi *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 1995]. Par cette technique, on détecte principalement un produit de coupure. Après action d'une glycosylase mono-fonctionnelle, le produit généré n'est pas coupé, mais contient un site abasique. Il est plus facile de séparer, du produit de départ, le produit de coupure que le produit contenant un site abasique. Aussi, lorsque l'étude porte sur une glycosylase mono-fonctionnelle, il est possible d'ajouter une AP-endonucléase dans le mélange réactionnel, qui va reconnaître et inciser le site abasique formé, jouant alors le rôle de révélateur. Il est également possible de couper ce site abasique par une méthode chimique utilisant une base (NaOH ou encore pipéridine) [Fischer *et al.*, 2006, An *et al.*, 2005, Engelward *et al.*, 1997]. Cette méthode est très sensible du fait de l'utilisation de la radioactivité et permet d'utiliser de faibles quantités d'ADN, typiquement entre 100 fmoles et 1 pmole. Cette méthode reste à ce jour la méthode de

référence pour les tests enzymatiques impliquant les glycosylases et les AP-endonucléases.

De plus en plus, on cherche à limiter l'utilisation de la radioactivité pour des raisons de sécurité et également pour simplifier au maximum les expériences. Ainsi, la fluorescence remplace peu à peu la radioactivité. La technique par analyse PAGE du produit de coupure d'un oligonucléotide lésé peut également se faire en fluorescence. Pour cela on remplace simplement le marquage au ^{32}P par un marquage fluorescent. De nombreux fluorophores existent sous la forme de phosphoramidites et peuvent ainsi être directement intégrés dans la séquence de l'oligonucléotide lors de sa synthèse chimique. Les technologies de mesure de fluorescence ont beaucoup évolué et sont devenues quasiment aussi sensibles que pour les mesures de radioactivité. De plus, l'utilisation de fluorophores permet une lecture directe du gel d'électrophorèse après migration alors que l'utilisation du ^{32}P nécessite une étape supplémentaire d'exposition pour visualiser le marquage des oligonucléotides déposés sur le gel.

Krekaul *et al.* ont utilisé cette méthode en insérant le fluorophore 5'-hexachlorofluorescéine (HEX) dans la séquence d'un oligonucléotide lésé [Kreklau *et al.*, 2001]. Celui-ci est ensuite hybridé au brin complémentaire et le duplex ainsi formé est incubé avec des extraits cellulaires. Les auteurs de cette étude se sont intéressés à plusieurs enzymes de la réparation dont Ape1, Aag et MGMT. Ils ont ainsi montré que l'utilisation de ce fluorophore permettait d'obtenir une sensibilité similaire au ^{32}P .

Une autre étude a également été menée pour mesurer la coupure par la glycosylase OGG1 sur un oligonucléotide, marqué par le fluorophore cy5, contenant une 8-oxoG [Hamann *et al.*, 2009].

Ces oligonucléotides ont également été modifiés afin de détecter ces activités de réparation (glycosylase et AP-endonucléase) en temps réel. Pour cela le principe, identique à celui exposé plus haut pour les molecular beacons, repose sur l'utilisation d'un fluorophore inséré à une extrémité d'un oligonucléotide et d'un quencheur situé sur l'extrémité du brin complémentaire. Lorsque les deux brins sont hybridés, le fluorophore est à proximité du quencheur et n'émet pas de signal de fluorescence. Lorsque, cette fois, une activité de réparation de la lésion, portée par l'un des deux brins, se produit cela conduit à une déshybridation de l'édifice, éloignant ainsi le quencheur du fluorophore qui émet alors un signal de fluorescence. Liu *et al.* ont ainsi inséré plusieurs bases uraciles sur un brin d'ADN fluorescent, hybridé à un brin complémentaire portant le quencheur dabcy1 [Liu *et al.*, 2007]. Après incubation avec la glycosylase mono-fonctionnelle UNG, les nucléotides désoxyuridines sont transformés en sites abasiques. Cela suffit à générer une déshybridation des deux brins conduisant à une apparition de fluorescence qui reflète ainsi l'excision de la base uracile (figure (1.25)).

Maksimenko *et al.* ont utilisé des oligonucléotides en forme d'épingle à cheveux ("hair-pin"), marqués à une extrémité par un fluorophore et à l'autre par un quencheur (figure 1.24 page 50), pour étudier la réparation de la base hypoxanthine et d'un analogue de site abasique, au sein d'extraits cellulaires, en temps réel [Maksimenko *et al.*, 2004]. Au laboratoire, A. Chollat-Namy a développé un système similaire pour détecter par apparition de fluorescence la réparation de diverses lésions de l'ADN, comme la thymine glycol, la 8-oxoG ou encore l'uracile [Chollat-Namy, 2006, Chollat-Namy *et al.*, 2005, Gasparutto, 2003]. L'utilisation de ces sondes pour la détection d'activités au sein d'extraits cellulaires peut néanmoins être limitée par leur dégradation due à la présence de nucléases cellulaires. En effet, la dégradation des sondes fluorescentes induit une apparition de signal non spécifique [Matsumoto *et al.*, 2010]. La modification

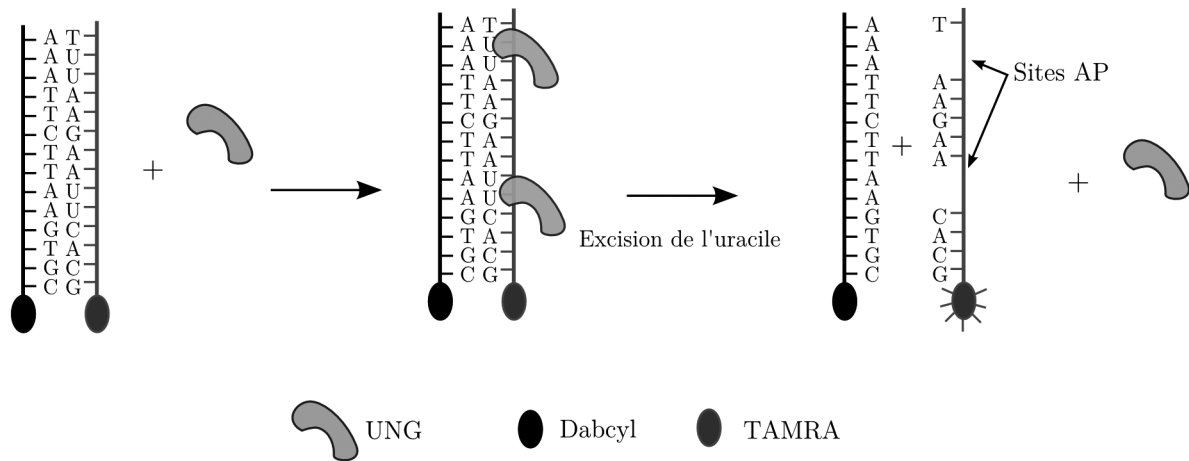


Figure 1.25 – Principe du test développé par Liu *et al.* pour mesurer l'activité de la glycosylase mono-fonctionnelle UNG, d'après [Liu *et al.*, 2007].

de ces sondes, avec notamment des liens phosphorotioates dans la boucle de l'hairpin, permet de limiter cette dégradation [Matsumoto *et al.*, 2010]. Un système similaire d'oligonucléotide quenché en duplex, a également été utilisé récemment pour cribler des inhibiteurs de la réparation [Simeonov *et al.*, 2009].

La spectrométrie de masse MALDI-TOF peut être utilisée pour étudier les activités de réparation de la BER [Darwanto *et al.*, 2009, Gasparutto *et al.*, 2003]. Pour cela des oligonucléotides lésés sont incubés avec les enzymes souhaitées et le produit de réaction obtenu est analysé par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est très informative dans ce cas, car elle permet d'accéder au mécanisme enzymatique avec une très bonne précision par rapport aux analyses PAGE. Néanmoins cette méthode nécessite une importante quantité de substrat (30-300 pmoles) et est moins sensible que les analyses par PAGE ou encore par mesure directe de fluorescence.

Récemment, plusieurs tests ont été mis au point, basés sur l'utilisation d'oligonucléotides supportés. L'utilisation d'un support solide permet de miniaturiser et de paralléliser les activités enzymatiques que l'on cherche à détecter. Ainsi, un "microarray" a été développé au laboratoire permettant la mesure d'activités de la BER par une mesure de disparition de fluorescence après coupure enzymatique [Sauvaigo *et al.*, 2004, Sauvaigo, 2001]. Pour ce test, des oligonucléotides lésés fluorescents marqués en 3' par une biotine sont utilisés. Ces derniers sont alors immobilisés dans les puits d'une micro-plaque, recouverts de streptavidine, dans lesquels la réaction enzymatique a lieu. Une biopuce a été également développée basée sur un système similaire d'oligonucléotides en duplex immobilisés par liaison biotine-streptavidine sur des lames de verre (S. Sauvaigo, communication personnelle, [Pons *et al.*, 2010]). Enfin, un autre biocapteur a récemment été mis au point pour la mesure de l'activité de la glycosylase bactérienne Fpg par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi) [Corne *et al.*, 2008].

Un test sur billes a également été mis au point pour détecter l'excision de la base hypoxanthine par la glycosylase Aag [Xia et O'Connor, 2001]. Pour cela, un oligonucléotide simple brin contenant la base lésée ainsi qu'une fonction biotine à l'extrémité 3', a été marqué au ^{32}P et hybridé avec son brin complémentaire. L'oligonucléotide double brin est alors incubé avec la glycosylase. Le duplex est ensuite traité en milieu basique ce qui a pour effet de couper l'oligonucléotide, au

niveau du site abasique généré par l'enzyme Aag. Ainsi, si cette glycosylase a agi, le fragment biotinylé n'est plus marqué au ^{32}P . La fraction biotinylée est finalement capturée par des billes streptavidine et quantifiée par mesure de radioactivité. Un signal radioactif résiduel est observé lorsque la glycosylase n'a pas agi. Cette technique semble néanmoins assez compliquée à mettre en oeuvre et utilise encore une fois la radioactivité.

Objectifs de l'étude

Nous avons vu que la réparation de l'ADN est un mécanisme essentiel à la conservation de l'information génétique. Plusieurs voies de réparation sont connues et sont chacune plus ou moins spécifiques de certaines lésions. Néanmoins, ce mécanisme est très complexe. Certaines lésions peuvent, par exemple, être réparées par plusieurs voies. De même les protéines intervenant dans ces voies de la réparation peuvent jouer plusieurs rôles dans ces mécanismes de réparation et sont également parfois impliquées dans d'autres processus biologiques. A ce jour de nombreux travaux ont été menés, conduisant parfois à des conclusions divergentes. Dans le cas des cancers, il semble que la réparation de l'ADN ait un rôle important à jouer. Par exemple, pour les traitements chimio- ou radio-thérapeutiques, ciblant notamment l'ADN, il semble exister un lien entre la résistance associée à ces traitements et les mécanismes de réparation de l'ADN. Des études ont également porté sur le développement d'inhibiteurs de la réparation de l'ADN pour augmenter l'effet de ces traitements. Prenons le cas de l'enzyme MGMT, qui est à ce titre très étudiée. Dans ce cas précis, certaines études ont montré un lien entre son expression, ou la méthylation du promoteur de son gène et la réponse à un traitement chimiothérapeutique. Néanmoins, il est difficile de conclure précisément sur cette corrélation directe notamment du fait que peu d'études ont porté sur l'activité de cette enzyme.

Il semble donc très intéressant de pouvoir mesurer les activités de réparation de l'ADN, afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu ainsi que leurs rôles dans ces pathologies. La mesure de certaines activités pourrait à terme permettre de mieux cibler les traitements anti-tumoraux et aider à la recherche de nouvelles molécules inhibitrices de la réparation augmentant l'efficacité des traitements.

Il est donc important de développer des outils fiables, faciles à mettre en oeuvre et permettant, à terme, de détecter plusieurs activités de réparation de l'ADN simultanément, à haut débit. Chacune des méthodes précédemment décrite présente ses avantages et ses inconvénients si bien qu'à ce jour aucun système ne fait l'unanimité. Les systèmes utilisant la radioactivité, bien que très sensibles, semblent mal adaptés pour des analyses en routine et à haut débit. Dans cet objectif, l'utilisation de sondes nucléiques fluorescentes semble mieux adaptée. De plus, le développement de systèmes supportés semble pertinent car cela permettrait la détection de plusieurs activités de réparation en parallèle, sur un même système miniaturisé. Ceci faciliterait ainsi les manipulations et permettrait de réduire les quantités de matériaux biologiques nécessaires à la réalisation des analyses. Au laboratoire, des études avaient été préalablement réalisées en solution sur une modèle de sonde d'oligonucléotide en hairpin. Ce système avait été appliqué à la détection des activités de glycosylases et d'AP-endonucléases, ainsi qu'à l'activité de réparation par réversion de la MGMT. Néanmoins, la mesure d'une activité enzymatique à partir d'un

extrait cellulaire dans ces conditions montre que les sondes sont sujettes à la dégradation par des nucléases. Dans ce cas, le greffage de telles sondes sur un support solide pourrait apporter une protection contre leur dégradation. De plus, les études menées sur la MGMT ont permis de conclure qu'il serait pertinent d'utiliser un test sur un support solide permettant le lavage du substrat entre les différentes étapes de l'analyse.

Au laboratoire, S. Sauvaigo a développé des systèmes miniaturisés, sous la forme de biopuces, pour mesurer les activités réparation de la BER et de la NER. Nous basant sur ces expériences, ainsi que sur l'expertise du laboratoire sur les lésions de l'ADN, nous avons souhaité développer un nouvel outil sur support permettant la détection d'activités de réparation de l'ADN par une mesure de fluorescence. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux activités de réparation de la voie de la BER et de la réversion.

L'objectif de ce projet était ainsi de développer cet outil sous le format d'une biopuce sur laquelle sont immobilisés des oligonucléotides contenant les lésions que l'on souhaite étudier. Ce microsystème doit donc nous permettre de détecter ces deux types d'activités (BER et réversion) à partir d'enzymes purifiées mais également à partir d'un extrait cellulaire. Il doit permettre une détection sensible, en accord avec la disponibilité du matériel biologique. De plus, celui-ci doit être suffisamment simple et rapide par rapport aux méthodes existantes pour permettre la mesure simultanée de plusieurs activités et permettre le criblage d'inhibiteurs de la réparation.

La première étape du développement a consisté à mettre au point les conditions d'immobilisation des oligonucléotides lésés. Ce travail fera l'objet du chapitre suivant (Chapitre 2) de ce manuscrit. Nous verrons ainsi qu'un premier design de sondes a été testé et a été appliqué à la détection d'une activité de la BER. Nous avons ensuite étudié une deuxième configuration de sonde substrat en hairpin qui sera présentée au cours du Chapitre 3. Puis nous avons procédé à la validation de ce système pour la détection d'activités de la BER à partir d'enzymes purifiées puis d'extraits cellulaires (Chapitre 3). Nous avons également réalisé une preuve de concept de ce système pour l'étude d'inhibiteurs de la réparation de la BER. Enfin, nous avons étendu le concept de cette biopuce à la mise au point d'un système ciblant la voie de réparation par réversion, par l'enzyme MGMT (Chapitre 3).

Parallèlement au développement de ce microsystème, nous avons développé de nouvelles sondes nucléiques pour étudier les modifications structurales induites par certaines lésions de l'ADN. Nous nous sommes en effet intéressés à l'aspect structural des dommages de l'ADN car la reconnaissance des déformations structurales est la première étape de nombreux processus biologiques impliquant ceux-ci. Ainsi, l'analyse de la structure de l'ADN lésé est essentielle pour une meilleure compréhension des conséquences biologiques des lésions. Le développement de des sondes permettant l'étude de l'ADN lésé, ainsi que l'étude de plusieurs lésions par la technique de résonance paramagnétique électronique pulsée (RPE pulsée) seront détaillés dans le Chapitre 4. Nous verrons également au cours de ce chapitre qu'un tel système a pour la première fois été appliqué à la détection d'une activité enzymatique.

Chapitre 2

Mise au point de la biopuce à ADN pour cibler la voie de la BER

Sommaire

2.1	Stratégies de greffage d'ADN sur support solide	58
2.2	Caractérisation de la biopuce	62
2.2.1	Caractérisation de la sonde oligonucléotidique	62
2.2.2	Caractérisation des lames	63
2.3	Choix du catalyseur et de la concentration en sonde à greffer	65
2.4	Choix du tampon de spotting	67
2.5	Spécificité de la réaction de greffage	69
2.6	Application à la détection des mésappariements	70
2.7	Application à l'étude de la réparation de l'ADN	73
2.7.1	Détection de l'activité d'excision de la Formamidopyrimidine-ADN- glycosylase	75
2.7.2	Détection de l'activité d'hydrolyse de l'AP-endonucléase humaine	77
2.7.3	Problèmes rencontrés et solutions envisagées	78
2.8	Conclusions	80

La première étape du développement de la biopuce pour détecter des activités de réparation de l'ADN, a consisté à mettre au point la chimie de greffage des oligonucléotides substrats. La détermination des conditions d'immobilisation sera présentée au cours de ce chapitre. Nous verrons également au cours de ce chapitre les premières applications de cette biopuce pour la détection d'activités de la BER.

2.1 Stratégies de greffage d'ADN sur support solide

Les biopuces à ADN sont traditionnellement utilisées pour étudier des phénomènes d'hybridation entre un brin d'ADN fixé sur un support solide, appelé sonde, et un brin d'ADN en solution, dit cible.

L'immobilisation de la sonde sur le support (lame de verre ou wafer de silicium) peut se faire par synthèse *in situ* ou par post-immobilisation [Pirrung, 2002, Bier *et al.*, 2008, Sassolas *et al.*, 2008].

La synthèse “*in situ*” utilise la chimie de synthèse des oligonucléotides (figure (2.1)). Dans ce cas, la séquence des sondes est assemblée nucléotide après nucléotide en réalisant une déprotection spécifiquement au niveau de la zone d'intérêt (figure (2.2)) [Fodor *et al.*, 1991]. C'est ce principe qui est utilisé pour les puces Affimétrie qui utilisent un groupement protecteur photolabile [Lockhart *et al.*, 1996]. La synthèse *in situ* est néanmoins utilisable uniquement pour de courts oligonucléotides, jusqu'à 25 nucléotides [Dufva, 2005]. En effet, les rendements d'étape ne sont jamais de 100%, ainsi le rendement global de la synthèse diminue très rapidement avec la longueur de l'oligonucléotide. De plus avec cette méthode aucune purification des sondes n'est réalisée.

C'est pourquoi la méthode dite de post-immobilisation est plus largement utilisée dans le domaine des puces à ADN. Dans ce cas, la sonde est modifiée avec un groupement chimique capable de réagir avec le support préalablement fonctionnalisé. Il n'y a alors plus cette limitation de taille puisque la sonde peut être purifiée avant immobilisation.

Beaucoup de chimies peuvent être utilisées pour cette application, d'autant que certaines sociétés commercialisent des lames avec diverses fonctions chimiques telles qu'une streptavidine ou une fonction amine primaire [Sassolas *et al.*, 2008]. Les plus simples consistent à immobiliser l'ADN par interaction électrostatique avec le support (par exemple en utilisant des lames polylysines). Néanmoins, les immobilisations utilisant ces interactions non-spécifiques sont peu favorables en terme de fonctionnalité et disponibilité des sondes pour l'hybridation postérieure avec la cible. L'ADN peut également être greffé de manière covalente, sans modification, à des lames fonctionnalisées par des époxydes, aldéhydes ou d'autres groupements capables de réagir avec une amine primaire. En effet, certaines bases de l'ADN (adénine, cytosine et guanine) contiennent une amine primaire, ce qui permet leur fixation. L'hybridation semble néanmoins moins efficace dans ces conditions [Dufva, 2005, Beier et Hoheisel, 1999].

D'autres chimies faisant intervenir une modification des sondes ont été développées pour un greffage spécifique (tableau (2.1), non exhaustif). Même si ces différentes chimies semblent conduire à un important taux de greffage, il est à noter que l'ADN étant chargé négativement, les surfaces positives ont tendance à favoriser les interactions non-spécifiques contrairement aux surfaces neutres ou négativement chargées [Zammatteo *et al.*, 2000].

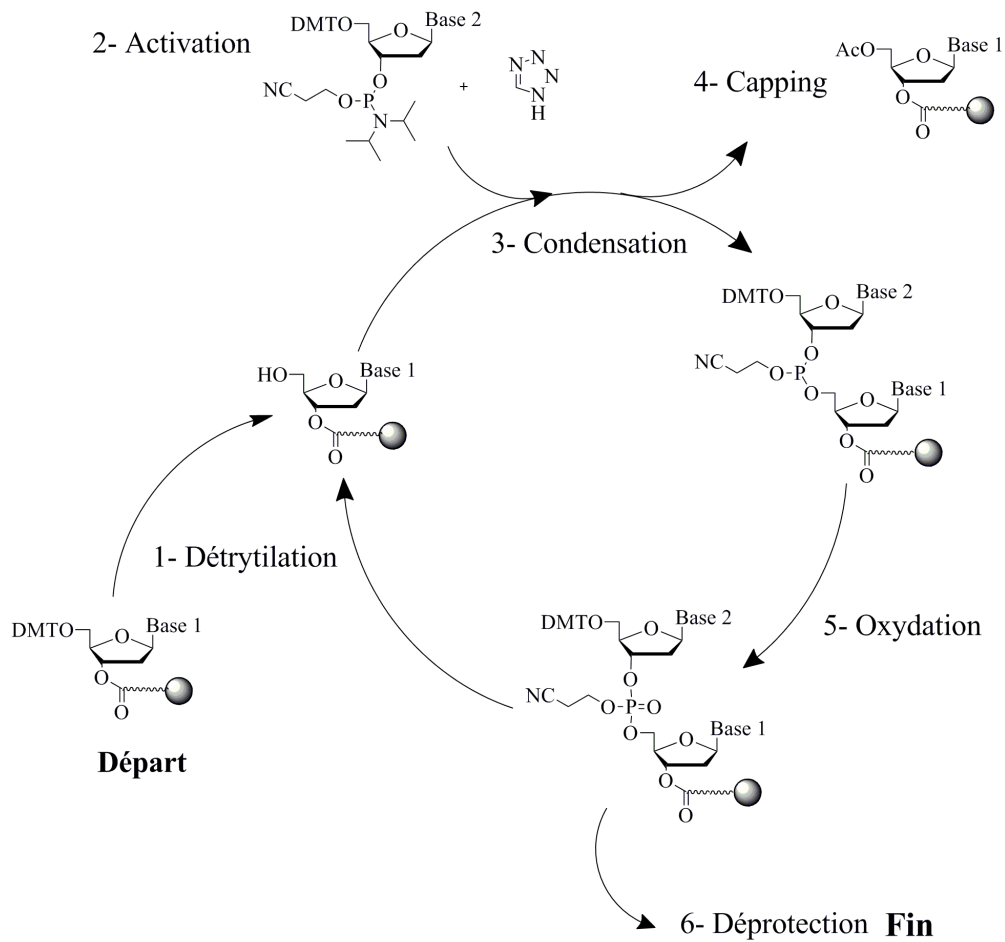


Figure 2.1 – Schéma de la synthèse d'ADN par la voie des phosphoramidites sur support ([Beaucage et Iyer, 1992]).

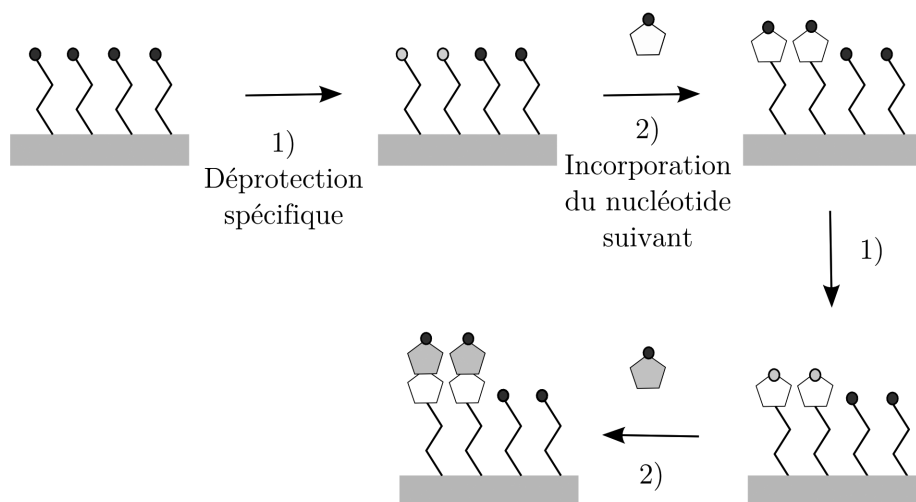


Figure 2.2 – Principe de l'immobilisation des sondes par synthèse in situ.

Modification de la sonde d'ADN	Modification de la surface	Référence
Thiols (-SH)	Or	[Strohsahl <i>et al.</i> , 2007, Csáki <i>et al.</i> , 2001]
	Mercaptosilanes	[Rogers <i>et al.</i> , 1999]
	Maleimide	[Fixe <i>et al.</i> , 2004, Chrisey <i>et al.</i> , 1996]
	Iodoacétyle	[Chrisey <i>et al.</i> , 1996]
Amines primaires (-NH ₂)	Aldéhydes	[Fixe <i>et al.</i> , 2004, Le Berre <i>et al.</i> , 2003, Zammattéo <i>et al.</i> , 2000]
	Epoxydes	[Preininger <i>et al.</i> , 2004]
	Isothiocyante	[Beier et Hoheisel, 1999, Preininger <i>et al.</i> , 2004]
	NHS-ester	[Beier et Hoheisel, 1999, Benders <i>et al.</i> , 2002]
	Imidoester	[Beier et Hoheisel, 1999]
	Acide carboxylique	[Zammattéo <i>et al.</i> , 2000]
Biotine	Avidine	[Fang <i>et al.</i> , 1999, Sabanayagam <i>et al.</i> , 2000]

Tableau 2.1 – Liste non exhaustive des chimies de greffage utilisées couramment pour l'immobilisation de sondes d'ADN sur des biopuces, adapté de [Dufva, 2005].

Parmi les nombreuses chimies existantes, la “chimie click” a récemment été utilisée pour ce type d'application. Cette chimie a été définie en 2001 par l'équipe du professeur Sharpless et regroupe différentes réactions chimiques répondant à des critères spécifiques [Kolb *et al.*, 2001]. Pour qu'une réaction appartienne à cette catégorie, celle-ci doit pouvoir être utilisée pour des applications nombreuses et variées, conduire à de très bons rendements, ne générer que des sous-produits inoffensifs et être stéréospécifique¹. De plus, elle doit pouvoir se réaliser dans des conditions de réaction simples. Le processus chimique doit idéalement être insensible à l'oxygène et à l'eau et nécessiter l'utilisation de solvants courants, non toxiques.

De nombreuses réactions chimiques peuvent remplir ces conditions mais la réaction de 1-3 cycloaddition dipolaire de Huisgen entre un alcyne et un azoture est la plus connue. Cette réaction mène à la formation de deux isomères contenant un cycle triazole. La découverte en 2002 de la catalyse de cette réaction entre un alcyne “terminal” et un azoture, par les sels de cuivre (I) simultanément par l'équipe du Pr Sharpless [Rostovtsev *et al.*, 2002] et celle du Pr Meldal [Tornøe *et al.*, 2002] a répandu son utilisation. Ceux-ci ont démontré que cette réaction pouvait être catalysée par des sels de cuivre (I) et conduisait à la formation rapide et unique du triazole 1,4 à température ambiante de manière quantitative (figure (2.3)). Le terme de chimie click fera par la suite référence uniquement à la réaction de 1-3 cycloaddition dipolaire sous catalyse de cuivre aussi appelée “Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition” ou CuAAC.

Cette réaction présente l'avantage de se réaliser dans des conditions simples (température ambiante et en milieu aqueux) et d'être biocompatible. Cette chimie a ainsi été très

¹Une réaction chimique est dite stéréospécifique si elle transforme deux produits ne différant que par leur stéréochimie (énantiomères, diastéréoisomères), en deux produits qui ne diffèrent également que par leur stéréochimie.

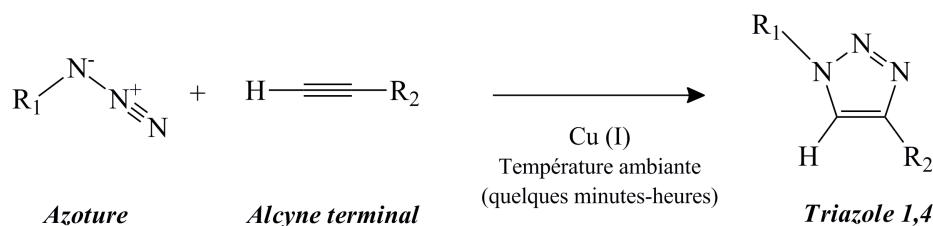


Figure 2.3 – Réaction de 1-3 cycloaddition dipolaire de Huisgen sous catalyse de cuivre (I).

largement appliquée à de nombreux domaines notamment à la bioconjugaison et à la modification de molécules d'ADN [Moses et Moorhouse, 2007, El-Sagheer et Brown, 2010]. De plus elle a été utilisée pour le greffage de biomolécules sur des supports solides [Fazio *et al.*, 2002, Rozkiewicz *et al.*, 2007, Lim *et al.*, 2008]. Seo *et al.* ont ainsi immobilisé de l'ADN en forme d'épingle à cheveux (hairpin) pour des applications en séquençage d'ADN [Seo *et al.*, 2005].

L'un des principaux avantages de cette chimie est qu'elle ne nécessite pas d'étape supplémentaire de post-immobilisation contrairement à d'autres chimies. Certaines chimies font appel à des fonctions capables de réagir *a posteriori* avec des molécules présentes dans la solution que l'on cherche à analyser. Dans le cas, par exemple, où l'on utilise des oligonucléotides aminés (amine primaire) que l'on greffe sur des lames actives (aldéhyde, époxyde, ester activé), il est nécessaire de bloquer la surface après l'étape de spotting. En effet, les fonctions réactives des lames qui n'ont pas réagi, peuvent réagir avec les amines primaires naturellement présentes dans les biomolécules (ADN, protéines...). Les fonctions époxydes peuvent par exemple réagir avec les groupements phosphates [Mahajan *et al.*, 2008].

La chimie click, quant à elle, fait intervenir deux fonctions chimiques qui sont très rarement présentes dans les systèmes biologiques. Ceci permet donc d'immobiliser sélectivement et de manière orientée les oligonucléotides contenant la fonction azoture ou alcyne avec une bonne orientation (pas de réaction avec les autres nucléotides). De plus, la lame obtenue est inerte vis-à-vis des systèmes biologiques auxquels elle sera exposée lors des étapes ultérieures [Kele *et al.*, 2009].

Au laboratoire, cette chimie a été utilisée pour le marquage d'oligonucléotides par diverses molécules, notamment pour l'incorporation de radicaux nitroxydes (voir chapitre 4 page 139). Pour toutes ces raisons, nous avons ainsi opté pour cette chimie afin d'immobiliser des sondes oligonucléotidiques sur des lames de verre. Pour utiliser cette chimie, nous avons incorporé une fonction alcyne dans la séquence des sondes à immobiliser et les avons greffées sur des lames fonctionnalisées par un azoture.

2.2 Caractérisation de la biopuce

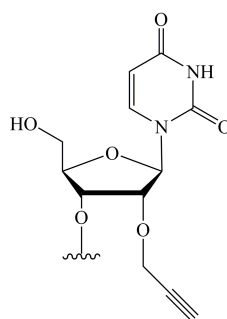
2.2.1 Caractérisation de la sonde oligonucléotidique

Une première sonde, nommée M (tableau (2.4a)), a été synthétisée via la chimie sur support des phosphoramidites. La fonction alcyne a été incorporée en 5' de la séquence à l'aide d'un nucléoside modifié, la 2'-O-propargyl uridine (figure (2.4b)). Pour cela, nous avons utilisé un phosphoramidite commercial fourni par la société GeneCust.

Sonde/cible	Séquence (5'→3')
Sonde M	X-TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA
Cible	cy3 GTC TCC TTG GGT ATC CGA TGT

(a) Séquences de la sonde M et de la cible fluorescente.

X :



(b) Structure du nucléoside, noté X : 2'-O-propargyl uridine.

Figure 2.4 – Séquences de la sonde M et de la cible fluorescente utilisées initialement pour la mise au point des biopuces et structure du nucléoside X modifié contenant la fonction alcyne introduit à l'extrémité 5' de la sonde M.

Une fois synthétisé, l'oligonucléotide a été déprotégé et libéré de son support par un traitement ammoniacal. Cette sonde a ensuite été purifiée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (r-HPLC, détection en absorbance UV à 260 nm). Sa pureté a été contrôlée par r-HPLC analytique et par spectrométrie de masse MALDI-TOF (figure (2.5)). Dans ces conditions, un seul pic fin est détecté en HPLC (à 20,7 minutes) ce qui montre la pureté et l'intégrité du produit purifié (figure (2.5a)). Le spectre de masse MALDI-TOF montre la présence de deux pics à 6449,4 g/mol et 3224,7 g/mol (figure (2.5b)). Le premier correspond au produit attendu ($[M-H]^-_{théorique}=6450,2$ g/mol). Le second pic correspondant à l'ion pseudo-moléculaire bi-chargé du produit ($[M-2H]^{2-}/2_{théorique}=3324,1$ g/mol). Ces analyses nous confirment donc que le produit purifié est celui attendu et démontre sa pureté et son intégrité.

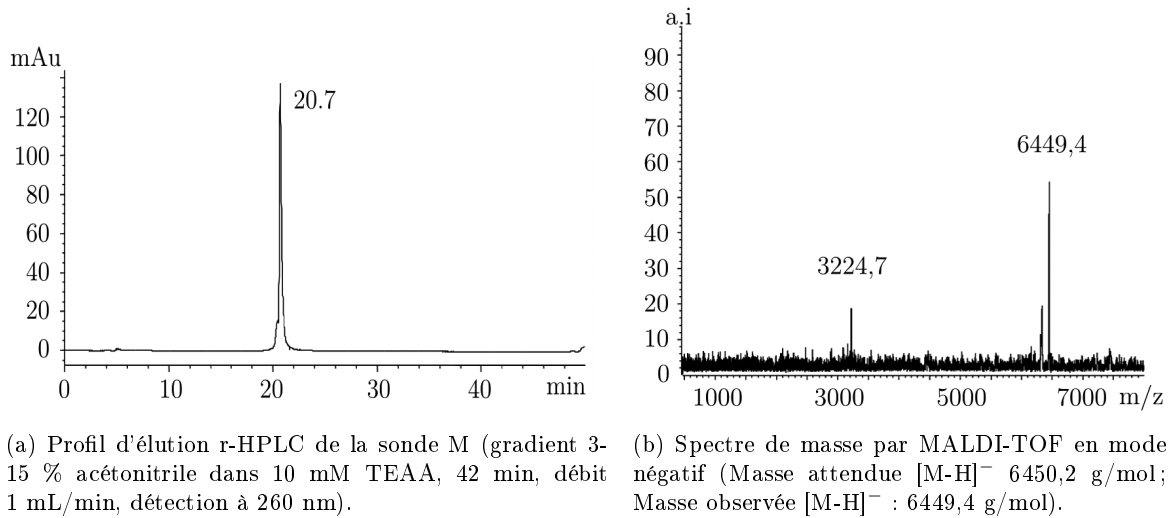


Figure 2.5 – Analyse de la sonde M par chromatographie liquide haute performance (a) et par spectrométrie de masse MALDI-TOF (b).

2.2.2 Caractérisation des lames

Une fois la sonde validée, elle a été immobilisée sur des lames fonctionnalisées par un azoture. La fabrication des lames fonctionnalisées ainsi que leur caractérisation ont été réalisées par G. Costa du laboratoire du LETI/DTBS/CEA grenoble (dirigée par F. Vinet) suivant des protocoles préalablement établis par leur équipe.

La première étape consiste à silaniser les lames de verre par un silane contenant une fonction chlore. Le chlore est ensuite substitué, lors d'une seconde étape, par un azoture en utilisant l'azoture de sodium (NaN_3) (figure (2.6)).

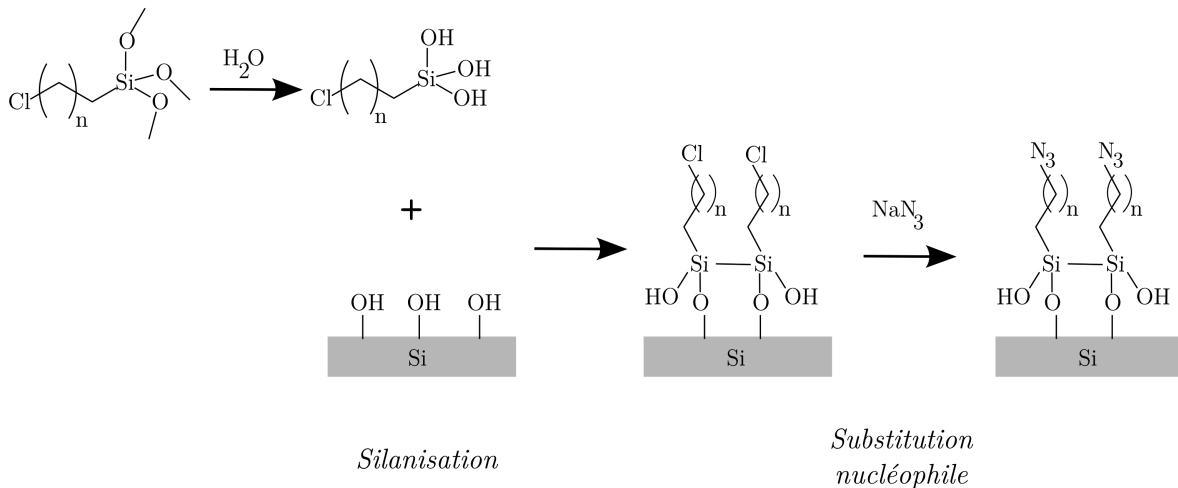


Figure 2.6 – Schéma de préparation des lames fonctionnalisées par un azoture ($n=6$ ou $n=11$).

Les lames ont d'abord été caractérisées par une mesure d'angle de contact. Cette mesure permet d'apprécier l'hydrophobicité du support. Pour cela, une goutte d'eau est déposée sur la surface à étudier et l'angle formé entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide, appelé "angle de contact" (θ_C), est mesuré (figure (2.7)). Les surfaces hydrophobes

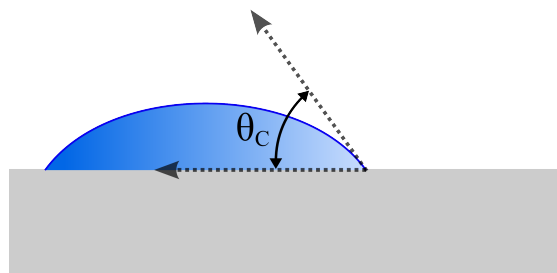


Figure 2.7 – Schéma de l'angle de contact.

correspondent à des angles de contact élevés et inversement pour les surfaces hydrophiles. A titre d'exemple, les surfaces fortement hydrophiles présentent des angles de contact lors du dépôt de goutte d'eau entre 0° et 30° .

Nous avons mesuré un angle de contact de $78,4^\circ$ pour les lames après silanisation avec le silane contenant la fonction chlore ($\text{Cl}-(\text{CH}_2)_6$) et un angle de $81,5^\circ$ pour les lames après substitution du chlore par l'azoture. Ces deux mesures indiquent que la surface des lames est assez hydrophobe. Le silane que nous avons utilisé possède une chaîne composée de six carbones, qui est donc assez hydrophobe. Des mesures similaires, recensées dans la littérature, indiquaient des angles de contact entre 84 - 85° pour des surfaces silanisées par un silane $\text{Br}-(\text{CH}_2)_{11}$ et entre 77 - 84° après substitution par l'azoture. Les mesures obtenues sont donc proches de celles mesurées dans la littérature [Prakash *et al.*, 2007].

Le potentiel zéta des lames, qui représente la charge à leur surface, a été évalué. Ainsi, dans les conditions de mesure, la charge à la surface des lames est négative (potentiel zéta mesuré = $-45,23 \pm 1,720$ mV, dans tampon KCl 1 mM, pH 6,5). Ce paramètre est favorable pour des manipulations avec l'ADN, chargé négativement, ce qui limite les interactions non-spécifiques des sondes avec la surface [Zammatteo *et al.*, 2000].

Des mesures de spectre moyen infrarouge (MIR) ont ensuite été réalisées afin de vérifier la bonne incorporation de la fonction azoture. Comme l'indique la figure (2.8), les lames "chloro" et "azoture" possèdent des bandes communes : une large à 3600 cm^{-1} , deux fines à 2930 cm^{-1} et 2860 cm^{-1} . On note également la présence d'une bande large vers 3200 cm^{-1} uniquement pour la lame "chloro" ainsi qu'une bande fine à 2095 cm^{-1} uniquement pour la lame "azoture".

En utilisant les tables théoriques d'absorption infrarouge, nous avons déterminé la correspondance de chaque bande observée sur ce spectre. Ainsi, la bande large à 3600 cm^{-1} , commune aux deux lames, est relative aux groupements OH des silanols² des lames. Les bandes fines à 2930 cm^{-1} et 2860 cm^{-1} correspondent aux fonctions CH_2 des silanes. La bande large vers 3200 cm^{-1} correspond à une molécule de H_2O . Le fait que celle-ci ne soit visible que pour la lame "chloro" provient du traitement des lames. En effet, la dernière étape de la préparation des lames "chloro" est un rinçage à l'eau, alors que le dernier rinçage effectué pour les lames "azoture" est un rinçage au dichlorométhane, ce qui a pour effet d'éliminer les traces d'eau. Enfin, la bande fine, observée à 2095 cm^{-1} uniquement pour la lame "azoture", est caractéristique de cette fonction. Ceci confirme donc la bonne fonctionnalisation des lames "azoture".

²Les silanols sont les composés chimiques formés d'un atome de silicium dont l'un des groupements auxquels il est relié est un hydroxyle.

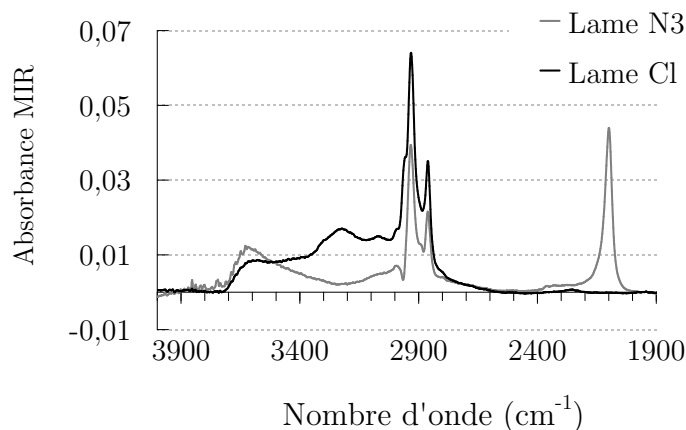


Figure 2.8 – Spectre infrarouge en absorbance d’une lame “chloro” (Cl) et d’une lame “azoture” (N3).

2.3 Choix du catalyseur et de la concentration en sonde à greffer

Comme nous l’avons vu précédemment, la réaction de chimie click nécessite un catalyseur sous forme de cuivre (I). Pour cela, diverses solutions ont été proposées dans la littérature : réduire des sels de cuivre (II) ou utiliser directement des sels de cuivre (I) en empêchant leur oxydation [Tornøe *et al.*, 2002, Gierlich *et al.*, 2006, Rostovtsev *et al.*, 2002]. Nous avons donc, dans un premier temps, comparé l’utilisation de l’iodure de cuivre (Cu(I)) en présence de diisopropyléthylamine (DIPEA) et celle du sulfate de cuivre (Cu(II)) en présence d’ascorbate de sodium.

Nous avons déposé manuellement, sur une lame fonctionnalisée par un azoture, 5 μL de solution de la sonde M diluée dans un mélange 50-50 H_2O -DMSO, en présence de l’un ou l’autre des deux types de catalyseurs (CuI/DIPEA ou CuSO_4 /ascorbate de sodium). Nous avons laissé la réaction se produire à température ambiante durant une nuit. Le DMSO est utilisé ici afin de réduire l’évaporation des dépôts, également appelés “spots”. De plus, cela permet d’augmenter la viscosité de la solution déposée ce qui améliore l’homogénéité des spots. En effet, il est connu que lorsque les dépôts sèchent, les molécules qu’ils contiennent ont tendance à se déplacer vers l’extérieur, donnant ainsi lieu à des spots en forme d’anneaux [Deegan *et al.*, 1997, Dufva, 2005]. C’est pourquoi des sels et des polymères sont souvent ajoutés afin de diminuer cet effet en augmentant la viscosité de la solution déposée.

La révélation de la fixation et de l’accessibilité de la sonde se fait par hybridation de la sonde immobilisée avec une cible de séquence complémentaire marquée par un fluorophore : la cyanine 3 (figure (2.9)). Nous avons ainsi incubé la lame avec une solution à 10 nM de cible fluorescente complémentaire à M. Comme nous pouvons le constater sur la figure (2.10), les signaux sont plus intenses pour l’iodure de cuivre (CuI) qu’avec le sulfate de cuivre (CuSO_4). Nous avons donc fait le choix d’utiliser ce catalyseur pour la suite des manipulations.

Différentes concentrations en sonde à déposer ont été testées. Nous avons ainsi pu constater qu’un plateau était atteint entre 5 μM et 15 μM (figure (2.11)). La concentration standard de spotting de l’équipe avec laquelle nous collaborons pour ces études étant de 10 μM , nous avons

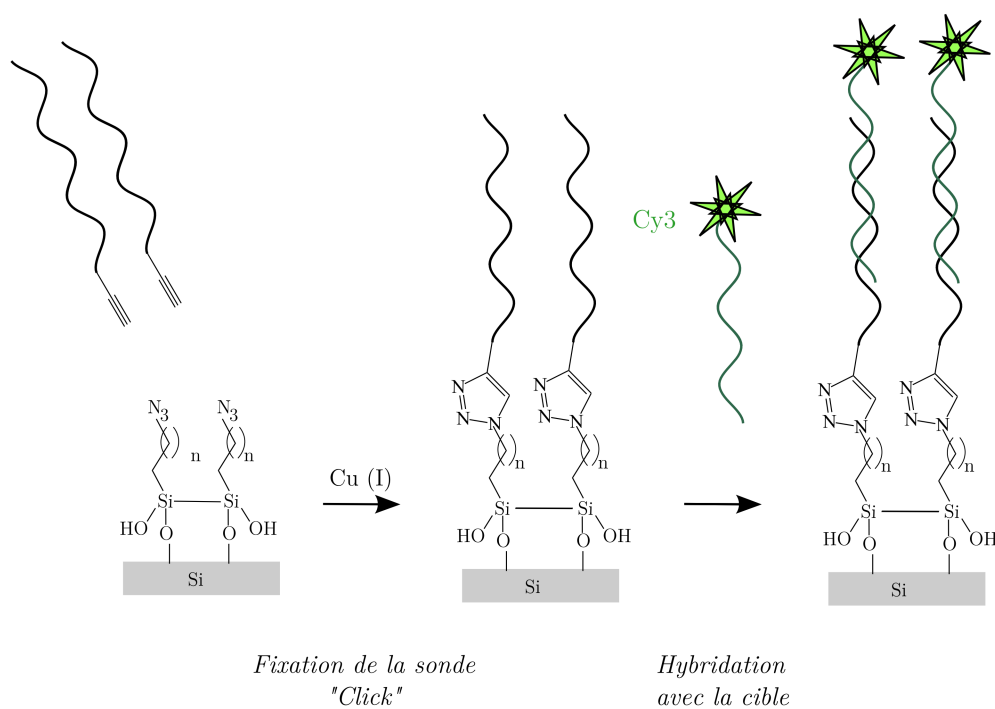


Figure 2.9 – Principe d'immobilisation de la sonde alcyne et de l'hybridation avec la cible complémentaire.

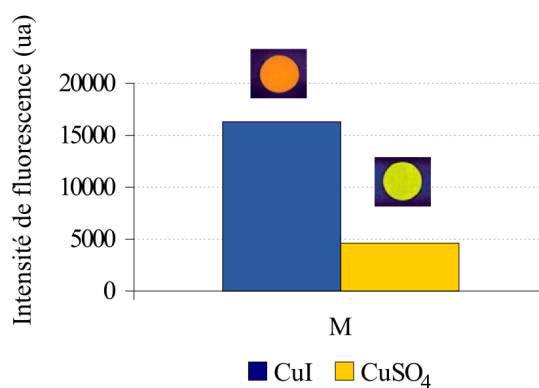


Figure 2.10 – Effet du catalyseur sur l'intensité de fluorescence des sondes après hybridation avec la cible.

choisi de conserver cette concentration pour la suite des manipulations.

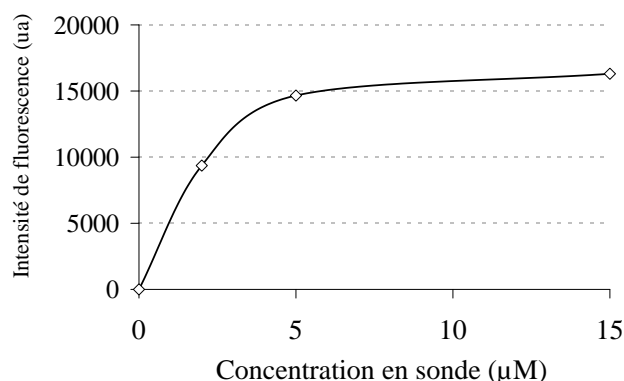


Figure 2.11 – Effet de la concentration en sonde M spottée sur l'intensité de fluorescence après hybridation avec la cible.

2.4 Choix du tampon de spotting

Nous avons ensuite utilisé un robot spotteur pour réaliser les dépôts d'oligonucléotide sur les lames. Dans ce cas, les dépôts réalisés sont beaucoup plus petits (0,7 nL contre 0,5 µL lors du spotting manuel) et reproductibles. Il est alors nécessaire d'optimiser le tampon de spotting. En effet, l'utilisation d'un robot spotteur n'est pas compatible avec tous les tampons puisque les aiguilles sont susceptibles de se boucher. De plus, le volume étant ici beaucoup plus petit, il est nécessaire de limiter l'évaporation des spots pour que la réaction ait le temps de se produire et afin également, d'obtenir les meilleures homogénéité et reproductibilité possibles. Comme nous l'avons expliqué plus haut, des sels et des polymers sont souvent ajoutés aux solutions déposées afin d'augmenter leur viscosité et de diminuer ainsi le mouvement des molécules du centre vers la périphérie du spot [Deegan *et al.*, 1997, Dufva, 2005]. De plus, le taux d'évaporation peut être limité par l'ajout d'autres agents, tels que le DMSO, de sorte à obtenir des spots plus homogènes.

Nous avons, dans un premier temps, spotté la sonde M en solution dans de l'eau. Cependant, étant donné qu'à cette échelle de volume, l'eau a tendance à vite s'évaporer, nous avons préparé d'autres tampons contenant du DMSO ou du glycérol (conditions 1 à 7 précisées dans le tableau (2.2)).

Comme nous pouvons le constater sur la figure (2.12), les spots contenant du DMSO ont un diamètre plus petit et sont moins homogènes que les spots ayant été spottés uniquement dans de l'eau ou avec une petite proportion de glycérol. La meilleure condition semble être la solution contenant 5 % de glycérol dans de l'eau.

Nous avons ensuite testé d'autres tampons de spotting rapportés dans la littérature [Rickman *et al.*, 2003, Gutmann *et al.*, 2004, Dawson *et al.*, 2005] et ajouté certains tampons déjà utilisés dans notre laboratoire (tableau (2.2), conditions 8 à 21). Dans l'objectif de limiter l'évaporation des gouttes déposées, une stratégie consiste à immobiliser les sondes dans une chambre dite humide, pour laquelle l'atmosphère est saturée en eau. Nous avons donc, également, testé cette condition.

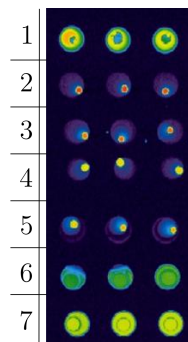


Figure 2.12 – Image en fluorescence d’une lame obtenue après spotting de la sonde M (en triplicat) dans différents tampons de spotting et hybridation avec la cible complémentaire fluorescente.

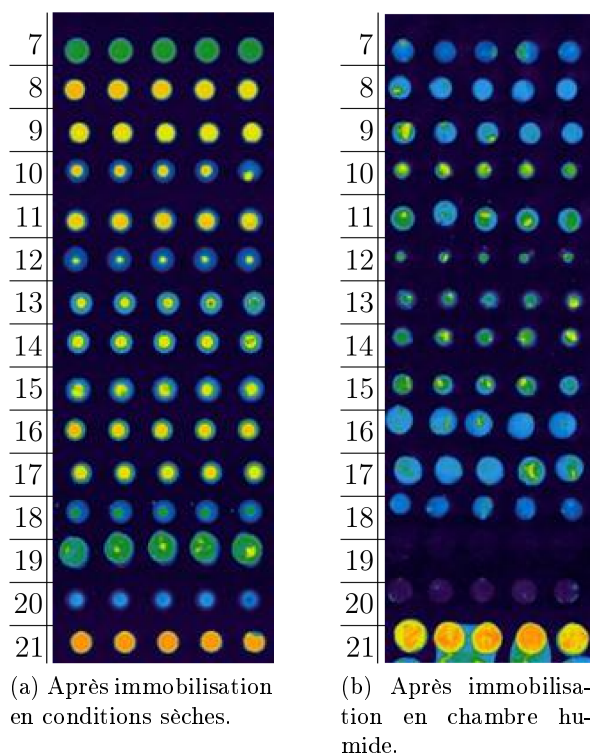


Figure 2.13 – Image en fluorescence d’une lame obtenue après spotting de la sonde M dans différents tampons de spotting et hybridation avec la cible complémentaire fluorescente.

Conditions n°	Compositions des tampons de spotting
1	H ₂ O
2	H ₂ O/DMSO (1 : 1)
3	H ₂ O/DMSO (2 : 1)
4	H ₂ O/DMSO (3 : 1)
5	H ₂ O/DMSO (9 : 1)
6	10 % glycérol dans H ₂ O
7	5 % glycérol dans H ₂ O
8	Phosphate de sodium 0,5 M, pH 6
9	Phosphate de sodium 0,5 M, pH 6,6
10	SSPE 1X
11	3X SSC
12	1X Tris NaCl
13	0,1 M PBS
14	0,25 M PBS
15	0,5 M PBS
16	5 % glycérol dans tampon phosphate de sodium (pH 6,61)
17	5 % glycérol dans SSC
18	5 % glycérol dans Tris NaCl
19	3X SSC, 0,05 % SDS
20	0,005 % sarkosyl dans tampon phosphate de sodium (pH 6,61)
21	Formiate de potassium 2 M (tampon A)

Tableau 2.2 – Composition des différents tampons de spotting testés.

D’après les images obtenues (figure (2.13)), il semble que certains tampons permettent d’obtenir des spots homogènes (tampon phosphate 0,5 M, pH 6 ; tampon phosphate 0,5 M, pH 6,61 ; tampon A). Le tampon A (formiate de potassium, 2 M) est le tampon qui donne les meilleurs signaux et donc celui que nous avons sélectionné pour la suite.

L’immobilisation en chambre humide diminue le signal et augmente la dispersion des diamètres des spots. De plus, dans ces conditions, les spots obtenus pour le tampon A ont tendance à s’étaler. Nous resterons donc en immobilisation “à sec” pour les prochaines expériences.

2.5 Spécificité de la réaction de greffage

Afin de vérifier la spécificité de la réaction de greffage, nous avons spotté sur une même lame, des sondes de même séquence mais possédant une fonction chimique en 5’ différente (tableau 2.3). Ainsi, la sonde M possède la fonction alcyne nécessaire à la réaction de chimie click. La sonde NH2 dispose, comme son nom l’indique, d’une fonction amine primaire. Enfin, la sonde SNM est dépourvue de fonction chimique particulière (extrémité 5’ OH).

Sondes	Séquences (5'→3')
M	X-TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA où X=dU-propargyle
NH2	X-TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA où X=NH2
SNM	TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA

Tableau 2.3 – Séquences et modifications chimiques en 5' des sondes utilisées pour vérifier la spécificité de la réaction de greffage.

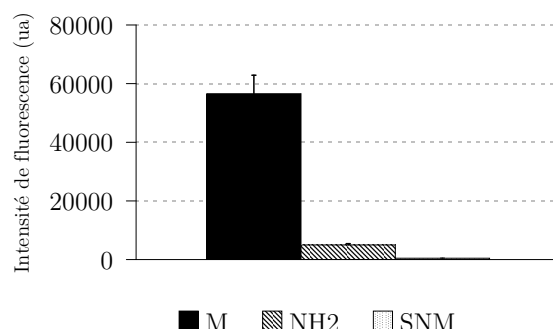


Figure 2.14 – Spécificité de la réaction de greffage des sondes M, NH2 et SNM (déterminée par mesure du signal fluorescent après hybridation avec la séquence cible marquée au cy3).

Comme l'indique la figure (2.14), le signal obtenu pour la sonde M est très nettement supérieur à ceux obtenus pour les deux autres sondes, ce qui prouve la spécificité de la réaction. On observe, cependant, un signal résiduel pour la sonde NH2. L'immobilisation de cette sonde semble provenir d'interactions non-covalentes entre la surface et la sonde. En effet, la fonction azoture est reliée à la surface des lames par une chaîne carbonée (C6). Dans le cas de la sonde NH2, la fonction amine est également reliée à la séquence d'intérêt par un "linker" carboné (C6) directement relié au dernier phosphate ce qui n'est pas le cas de la sonde SNM. Il se peut donc que la fixation non nulle de la sonde NH2 soit due à une interaction hydrophobe entre la chaîne carbonée de la lame et celle de la sonde aminée.

2.6 Application à la détection des mésappariements

Une fois les conditions de greffage établies, nous avons appliqué cette technique à la détection de mésappariements ponctuels entre la sonde et la cible. Le principe est d'immobiliser des sondes dont les séquences diffèrent d'un ou deux nucléotides et de comparer leur signaux obtenus après hybridation avec une même cible. La fluorescence observée pour chaque sonde dépend ainsi de la capacité de la cible à s'hybrider avec les différentes sondes. Nous nous attendons donc à obtenir une fluorescence plus faible pour les sondes ayant un ou plusieurs mésappariements.

Pour cela, nous avons immobilisé des sondes (M, M1, M2 et M3) dont les séquences diffèrent d'une ou deux bases (tableau (2.4)) et nous les avons hybridées ensuite avec la cible complémentaire à M à 10 nM. Chaque sonde a été déposée en triplicat sur 12 "blocs" identiques d'une même lame comme indiqué sur la figure (2.15).

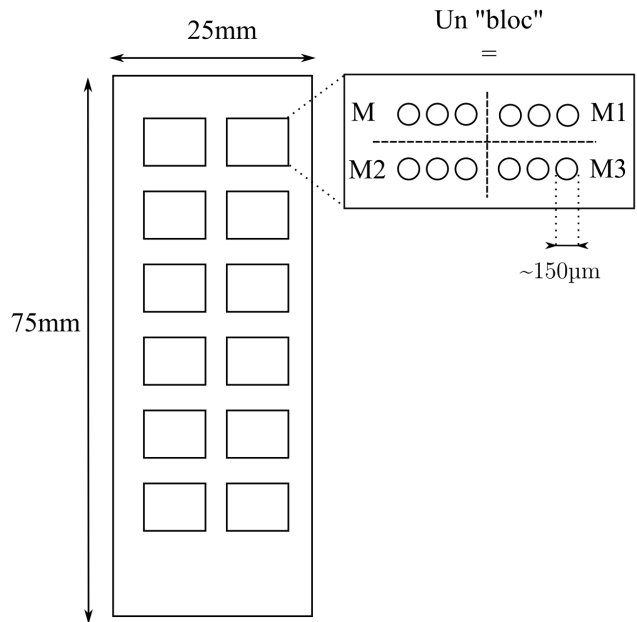
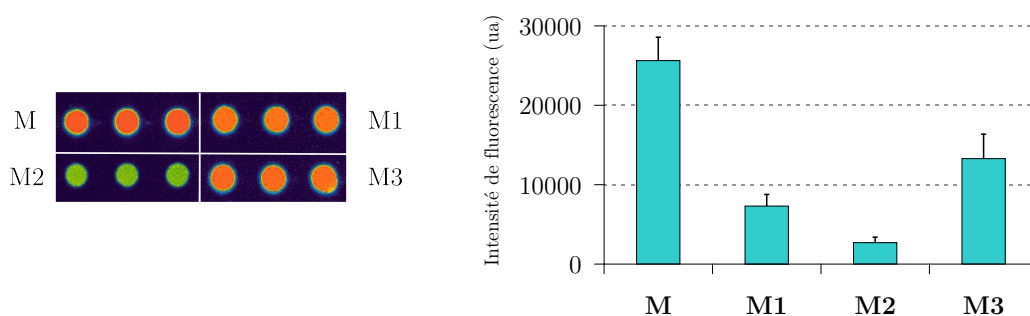


Figure 2.15 – Représentation schématique de la disposition des spots de sondes sur la lame.

Sondes/cible	Séquences (5'→3')
M (complémentaire à la cible)	X-TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA
M1 (mésappariement T : G)	X-TT TTT TCG GAT A <u>TC</u> CAA GGA
M2 (mésappariements C : T, T : G)	X-TT TTT TCG GAT <u>CCT</u> CAA GGA
M3 (mésappariement A : G)	X-TT TTT TCG GAT AC <u>A</u> CAA GGA
Cible	cy3 GTC TCC TTG GGT ATC CGA TGT

Tableau 2.4 – Séquences des sondes et de la cible utilisées pour les expériences de détection de mésappariements.



(a) Image en fluorescence des sondes immobilisées.

(b) Moyenne de l'intensité de fluorescence .

Figure 2.16 – Détection des mésappariements après hybridation avec la cible fluorescente complémentaire à la sonde M .

L'image en fluorescence d'un des blocs, obtenue dans ces conditions est présentée sur la figure (2.16a). La quantification de la fluorescence des spots correspondant aux différentes sondes a été réalisée sur l'ensemble des répliqués (figure (2.16b)). D'après les résultats mesurés et présentés sur la figure (2.16), nous obtenons un signal détectable pour les quatre sondes avec un très faible bruit de fond. Nous remarquons également que le signal de fluorescence dépend de la séquence de la sonde utilisée.

Comme nous venons de le dire, le bruit de fond est très faible et nous obtenons de très bons rapports "Signal/Bruit", maximal de l'ordre de 2900 pour la sonde M et minimal de l'ordre de 300 pour la sonde M2. Ce faible bruit de fond peut être attribué au fait que la charge de la surface n'est pas positive (voir paragraphe 2.2.2 page 63), ce qui limite l'absorption non spécifique de l'ADN chargé négativement [Zammatteo *et al.*, 2000].

De plus, comme nous l'attendions, le signal mesuré en fluorescence dépend de la séquence de la sonde et l'intensité maximale est obtenue pour la sonde M, totalement complémentaire à la cible (figure (2.16)). Les intensités de fluorescence pour les sondes possédant un mésappariement (M1 et M3) sont inférieures à celle obtenue pour M. De plus, le signal pour la sonde M3 (A : G) est plus intense que pour la sonde M1 (T : G). Il est rapporté dans la littérature que l'adénine peut former deux liaisons hydrogènes avec la guanine ce qui pourrait expliquer la plus forte intensité du duplex M3/cible [Kan *et al.*, 1983]. De plus, Naiser *et al.* ont précédemment montré, à l'aide d'une puce à ADN, que le mésappariement A : G conférerait une meilleure stabilité au duplex d'ADN que le mésappariement T : G ce qui est conforme à ce que l'on observe [Naiser *et al.*, 2008]. La sonde M2 présente, quant à elle, un signal très faible, bien inférieur à la sonde correctement appariée et aux deux sondes présentant un seul mésappariement. Cette sonde possédant deux mésappariements, il apparaît donc tout à fait normal d'observer un signal fluorescent faible.

Grâce à cette méthode, basée sur la mise au point de nouvelles puces d'oligonucléotides immobilisés par chimie click, nous avons été en mesure de distinguer zéro, un ou deux mésappariements pour une concentration en oligonucléotide cible de 10 nM. Les études menées sur la détection de mésappariements sont réalisées à des concentrations en cible très différentes selon les études, allant de quelques nM à 40 μ M [Mahajan *et al.*, 2008, Patnaik *et al.*, 2007,

Du *et al.*, 2005, Lim *et al.*, 2008, Healey *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2005]. Nous n'avons pas étudié la limite de détection de notre système car nous souhaitons, ici, uniquement faire la preuve de la fonctionnalité des oligonucléotides immobilisés par chimie click. Il est néanmoins possible de diminuer la concentration en cible en jouant sur les paramètres d'incubation (tampon d'hybridation, temps et température d'incubation) de sorte à pouvoir détecter 1 ou 2 mésappariements et à les distinguer de la sonde parfaitement complémentaire. Notre intérêt principal se portant sur l'étude de la réparation des lésions de l'ADN, que nous allons développer au paragraphe suivant, nous avons choisi de ne pas optimiser ces conditions pour cette application de détection de mésappariements.

2.7 Application à l'étude de la réparation de l'ADN

Une fois le système validé pour la détection des mésappariements, nous avons voulu l'appliquer à la détection d'activités enzymatiques de réparation de l'ADN. Nous avons, pour cela, incorporé deux oligonucléotides modifiés contenant des substrats pour deux enzymes de la réparation par excision de base. Nous avons ainsi préparé une sonde contenant une 8-oxoguanine et une autre contenant un tétrahydrofurane (THF) (figure (2.17) et tableau (2.5)).

La 8-oxoguanine (notée G₈) provient de l'oxydation de la guanine (voir paragraphe 1.2.1.3 page 10). Comme nous l'avons vu précédemment (voir paragraphe 1.5.2.2 page 32) cette lésion est réparée, lorsqu'elle est appariée à une cytosine, par la glycosylase bi-fonctionnelle Ogg1 chez l'homme et par la glycosylase bi-fonctionnelle Fpg chez les bactéries.

Le THF est un analogue stable de site abasique. Il est utilisé à la place du "vrai" site abasique, car comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le site abasique peut se réarranger et conduire à une cassure de chaînes (voir paragraphe 1.2.3 page 16). Cet analogue est réparé, au même titre que le "vrai" site abasique, par les AP-endonucléases [Takeshita *et al.*, 1987].

Nous avons donc cherché à détecter, avec la biopuce nouvellement mise au point, les activités enzymatiques d'incision de ces deux substrats. Pour l'activité de réparation de la 8-oxoG nous avons utilisé la glycosylase purifiée bactérienne Fpg. Pour l'incision du THF nous avons utilisé l'AP-endonucléase humaine purifiée, Ape1. Ainsi, avec ces deux lésions nous pouvons réaliser une preuve de concept de ce biocapteur pour la détection des étapes d'incision de la réparation de l'ADN et cibler des activités de glycosylases bi-fonctionnelles et des AP-endonucléases.

La détection de l'activité de ces enzymes repose sur un phénomène de disparition de fluorescence (figure (2.18)). En effet, après l'étape d'hybridation, les sondes sont appariées à une cible fluorescente dont on peut mesurer le signal. Les enzymes que nous avons choisies agissent de telle sorte que, lorsqu'elles reconnaissent leur substrat, elles coupent le lien phosphodiester au

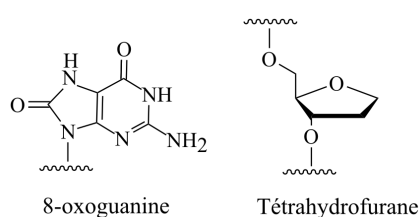


Figure 2.17 – Formules chimiques de la lésion 8-oxoguanine et du tétrahydrofurane (analogue stable d'un site abasique).

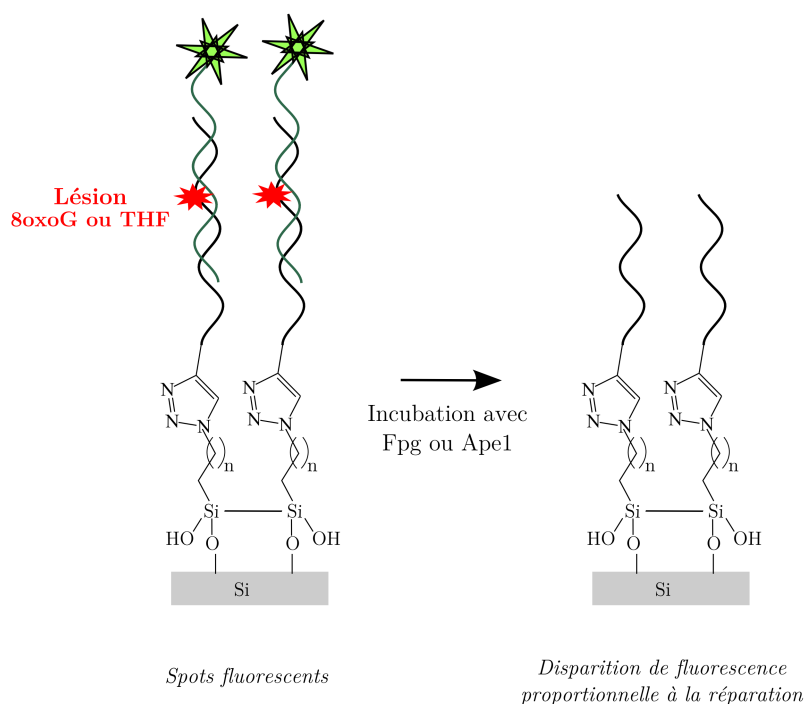


Figure 2.18 – Principe de la détection d’activités de réparation sur la puce.

Sondes	Séquence (5'→3')
M4 (G_8 : C)	X-TT TTT TCG G_8 AT ACC CAA GGA
M5 (G_8 : C)	X-TT TTT TTT TTT TTT TTC G G_8 A TAC CCA AGG A
M6 (G_8 : A)	X-TT TTT TTT TTT TTT TTC GGA G_8 AC CCA AGG A
M8 (2x G_8 : C)	X-TT TTT TTT TTT TTT TTC G G_8 A TAC CCA A G_8 G A
M9 (THF : G)	X-TT TTT TCG GAT AC(THF)CAA GGA

Tableau 2.5 – Séquences des sondes utilisées pour la détection d’activités enzymatiques de la BER, où X représente le nucléotide contenant la fonction alcyne.

niveau de la lésion. Cela conduit à une déshybridation du duplex sonde/cible et ainsi induit une disparition de fluorescence au niveau des sondes substrats. Ce principe est applicable à toutes les enzymes de la réparation qui induisent une coupure du squelette phosphate.

Pour ces expériences, nous avons spotté, sur chaque lame, douze blocs identiques, chacun composé des différentes sondes (cinq réplicats par sonde). Les sondes spottées varient selon les manipulations enzymatiques réalisées par la suite. Une fois les lames spottées, elles sont hybridées suivant le protocole établi précédemment. Les lames sont ensuite incubées 1 h à 37 °C avec les différentes solutions enzymatiques (deux réplicats par lame). Nous avons alors quantifié l’intensité de fluorescence des spots, notée I , sur les lames et calculé un pourcentage de coupure pour chaque sonde. Ce pourcentage de coupure (noté P) correspond au rapport des signaux de fluorescence entre un bloc incubé avec une concentration d’enzyme (bloc x) et un bloc témoin ayant été incubé uniquement avec du tampon enzymatique (bloc témoin). Néanmoins, du fait d’une possible variabilité intra-lame nous normons les valeurs par rapport à celles obtenues pour la sonde témoin M qui, elle, n’est pas substrat pour ces enzymes (équation 2.1).

$$P(\%) = \left(1 - \frac{I_{\text{sonde-bloc } x} \times I_{\text{moyenne M-bloc témoin}}}{I_{\text{moyenne sonde-bloc témoin}} \times I_{\text{M-bloc } x}}\right) \times 100 \quad (2.1)$$

2.7.1 Détection de l'activité d'excision de la Formamidopyrimidine-ADN glycosylase, Fpg

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'incubation avec différentes quantités de Fpg (exprimées en unité d'enzyme, notée "U"³) sur l'intensité de fluorescence des différentes sondes spottées, ici M, M3, M4, M5, M6 et M8, et hybridées en double brin.

Comme l'indique la figure (2.19a), nous observons une disparition de fluorescence spécifique pour les spots correspondant aux sondes M4, M5 et M8. De plus, pour ces sondes le taux de coupure dépend de la quantité de Fpg déposée (figure (2.19b)).

Seules les trois sondes M4, M5 et M8 contiennent une 8-oxoguanine appariée à une cytosine, ce qui constitue un substrat connu de la Fpg. La coupure observée de ces sondes est donc en accord avec ce que nous attendions.

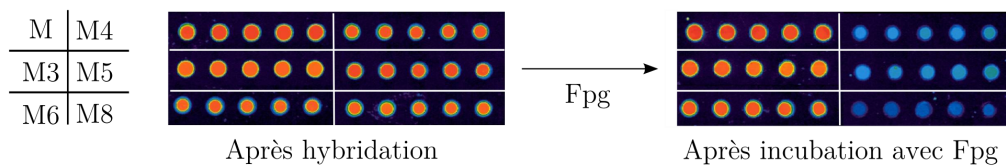
La sonde M5 diffère de la sonde M4 par son "linker" reliant la sonde à la surface. En effet, nous avons souhaité vérifier l'accessibilité de la lésion à l'enzyme c'est pourquoi nous avons incorporé la sonde M5 possédant la même séquence que la sonde M4 mais avec un linker plus long de dix désoxythymidines, l'éloignant ainsi de la surface de la lame. Comme l'indique la figure (2.19b), nous n'observons pas de différence de coupure entre les deux sondes. Il semble donc que, dans ces conditions, les sondes soient bien accessibles à l'enzyme.

Contrairement à la sonde M5, la sonde M6 n'est pas coupée quelle que soit la quantité de Fpg. La sonde M6 se différencie de M5 par la position de la lésion 8-oxoguanine. En effet, pour la sonde M6 la lésion n'est pas appariée à une cytosine mais à une adénine. Or, la Fpg est connue pour reconnaître uniquement la 8-oxoguanine lorsque celle-ci est appariée avec une cytosine (voir paragraphe 1.5.2.2 page 32). Le résultat observé est ainsi en accord avec ce que nous attendions, compte tenu de la spécificité de l'enzyme Fpg.

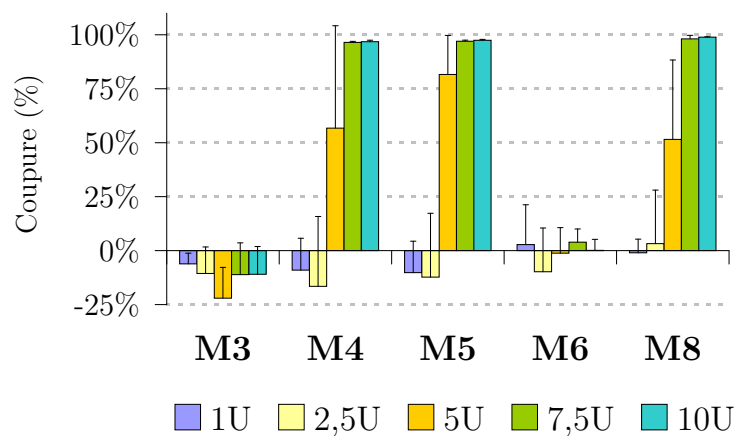
La sonde M8 a, quant à elle, été incorporée afin d'observer si la présence de deux sites "G₈ : C" au lieu d'un seul, augmentait l'efficacité de coupure. Tout comme la sonde M5, elle dispose d'un linker plus long de dix désoxythymidines. Si nous comparons la sonde M8 à la sonde M5, nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas d'effet significatif sur le pourcentage de coupure quelle que soit la quantité de Fpg utilisée.

Nous avons ainsi pu détecter, au cours de cette première étude, une activité de coupure spécifique sur support. Nous avons pu observer une disparition du signal de fluorescence quasiment complète pour les sondes substrats pour l'enzyme ciblée, ici la Fpg. Ceci prouve donc que l'ADN substrat est bien accessible à l'enzyme dans ces conditions et que cette dernière est fonctionnelle sur ce type de biocapteur.

³Une unité d'enzyme correspond à la quantité de substrat transformé par unité de temps. Dans le cas de Fpg et d'Ape1, le fournisseur définit l'unité de ces enzymes de la manière suivante : une unité d'enzyme transforme 1 pmole de son substrat en 1 h.



(a) Images des spots après hybridation et après incubation avec 10 U de Fpg.



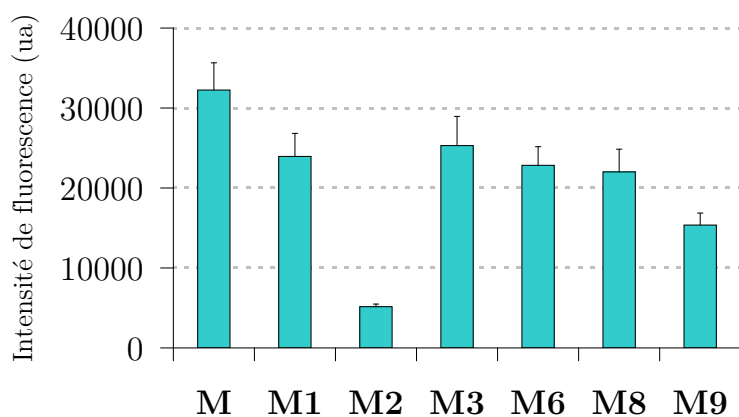
(b) Pourcentage de coupure après incubation avec une gamme de quantité de Fpg (exprimée en unité d'enzyme).

Figure 2.19 – Effet de l'incubation avec Fpg sur l'intensité de fluorescence des différents duplex sondes/cible.

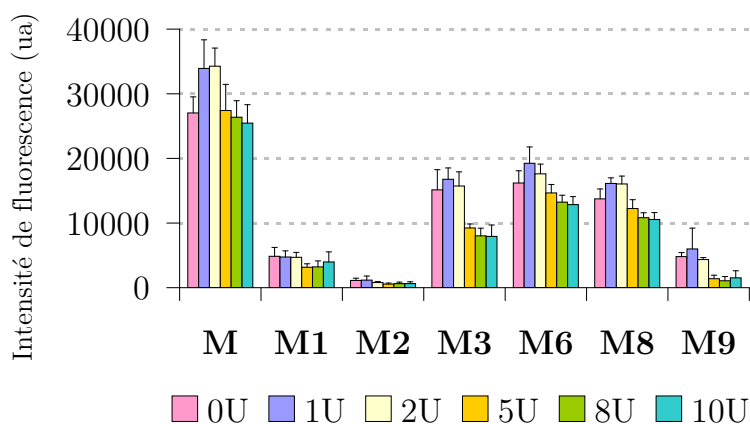
2.7.2 Détection de l'activité d'hydrolyse de l'AP-endonucléase humaine, Ape1

Nous nous sommes ensuite intéressés à une autre activité enzymatique de la réparation par excision de base de l'ADN, celle de l'AP-endonucléase humaine, Ape1. Pour cela, nous avons utilisé la sonde M9 contenant un analogue de site abasique, le tétrahydrofurane (THF) (tableau (2.5)). Nous avons ensuite procédé de manière similaire à l'expérience précédente concernant l'enzyme Fpg et avons déterminé les intensités de fluorescence après incubation avec une gamme d'Ape1.

En observant les intensités de fluorescence mesurées après incubation avec une gamme d'Ape1 (figure (2.20b)), nous observons une diminution des signaux de fluorescence non seulement pour la sonde M9 mais également pour M3 et dans une moindre mesure pour M6 et M8. Ceci est contraire à ce que l'on attendait, puisque seule la sonde M9 est substrat pour cette enzyme.



(a) Intensités de fluorescence après hybridation.



(b) Intensités de fluorescence après incubation avec Ape1.

Figure 2.20 – Intensités de fluorescence “Avant/Après” incubation avec Ape1.

Lors de cette manipulation, nous constatons une importante perte de fluorescence pour les

sondes mésappariées ou lésées après incubation avec le tampon enzymatique (figure (2.20a) et série “0U” de la figure (2.20b)). Il semble donc qu’il y ait eu une déshybridation partielle des sondes mésappariées, ce qui tend à fausser le pourcentage de coupure calculé. De plus, le signal pour la sonde M9 étant très faible, même sans incubation avec Ape1, il est difficile de conclure clairement sur l’activité de cette enzyme dans ces conditions.

2.7.3 Problèmes rencontrés et solutions envisagées

Nous avons rencontré des problèmes de perte de signal lors de la manipulation précédente pour la détection de l’activité d’Ape1. Nous avons donc voulu étudier l’influence de l’incubation avec le tampon enzymatique de cette enzyme sur le signal de fluorescence pour les différentes sondes, après hybridation des sondes avec la cible.

Nous avons donc comparé les intensités de fluorescence pour chaque sonde après chaque étape du protocole expérimental :

- ★ après hybridation avec la cible (a)
- ★ après hybridation avec la cible et lavage de la lame (b)
- ★ après hybridation, lavage, incubation avec le tampon enzymatique d’Ape1 (1 h à 37 °C) suivi d’un lavage (c)

Nous avons ainsi pu constater une perte progressive de signal de fluorescence au cours des étapes du protocole et ceci pour toutes les sondes (figure (2.21)). Pour chaque sonde “Mx”, nous avons également calculé le rapport entre l’intensité de fluorescence obtenue pour la sonde M et celle de la sonde “Mx” et avons étudié l’évolution de ce rapport au cours des étapes successives (figure (2.22)). Ceci permet d’étudier si les duplex sonde/cible se déshybrident tous de manière équivalente ou s’il existe une différence selon la séquence de la sonde.

Nous avons ainsi constaté que ce rapport reste stable après lavage (condition b) pour les différentes sondes modifiées. Néanmoins, après incubation avec le tampon enzymatique, nous observons une importante augmentation de ce rapport pour les sondes M1, M8 et M9, ce qui montre une déshybridation plus importante pour ces sondes. Ce rapport varie beaucoup moins pour les sondes M3 et M6.

Ces deux dernières sondes, M3 et M6, contiennent des lésions qui déstabilisent moins le duplex sonde/cible que pour les trois autres sondes (M1, M8 et M9). En effet, comme nous l’avons vu précédemment, la sonde M3 (A : G) présente un mésappariement moins déstabilisant que pour M1 (T : G). La sonde M6 quant à elle, contient une 8-oxoguanine appariée à une adénine. Il est connu que cette base endommagée peut s’apparier avec une adénine [McAuley-Hecht *et al.*, 1994]. Pour cet appariement la lésion 8-oxoG adopte une conformation *syn* et s’apparie avec une adénine en conformation *anti* par deux liaisons hydrogènes [Klungland et Bjelland, 2007].

Les modifications des sondes M1, M8 et M9 sont les plus déstabilisantes de l’ensemble des sondes immobilisées ici. Nous avons déjà évoqué le cas de la sonde M1, mais les lésions des sondes M8 et M9 sont également déstabilisantes pour le duplex sonde/cible. En effet, la sonde M8 dispose de deux 8-oxoguanines. De plus, la sonde M9 possède un analogue de site abasique pour lequel il n’y a donc pas d’appariement possible. Il est donc probable que cette déstabilisation initiale augmente d’autant plus la déshybridation observée lors de l’étape d’incubation avec le tampon enzymatique.

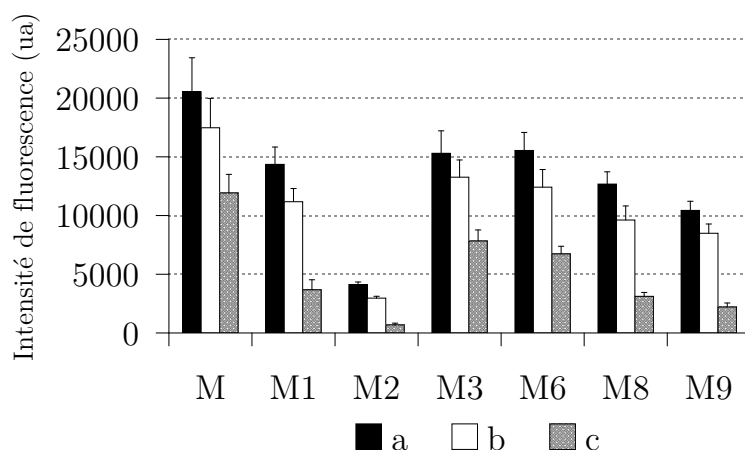


Figure 2.21 – Comparaison des intensités de fluorescence après chaque étape du protocole expérimental.

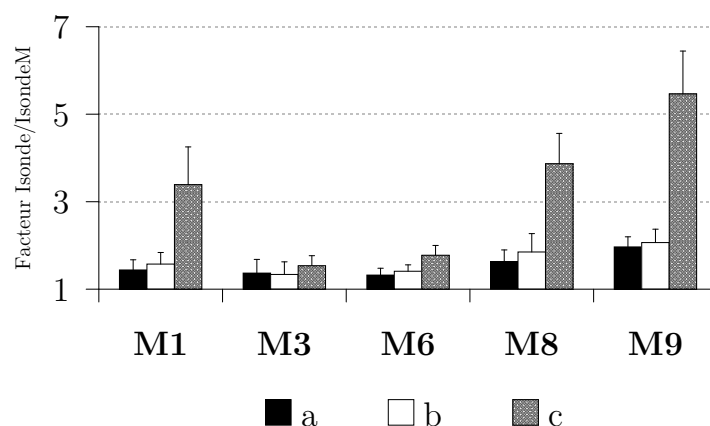


Figure 2.22 – Evolution du rapport des intensités de fluorescence au cours du protocole d'incubation enzymatique. (a) après hybridation ; (b) après hybridation et lavage ; (c) après hybridation, lavage, incubation avec le tampon enzymatique de l'Ape1 (1h à 37°C) suivi à nouveau d'un lavage.

Il semble donc que cette configuration en duplex ne soit pas favorable pour détecter l'activité enzymatique de l'Ape1. Il est probable que la longueur de la sonde (15 nucléotides appariés) ne confère pas une hybridation suffisamment stable dans nos conditions lorsque celle-ci contient une lésion déstabilisante telle qu'un site abasique. Nous avons donc décidé, dans la suite du travail, d'adopter un nouveau "design" de sonde auto-complémentaire, dit en "hairpin" (épingles à cheveux). L'utilisation de cette molécule unique, dont le détail sera développé au chapitre suivant,

nous permet de ne pas avoir d'étape d'hybridation ce qui devrait apporter une meilleure reproductibilité des signaux. De plus, la stabilité du duplex sera bien plus importante, ce qui évitera les problèmes de déshybridation partielle du duplex lors de l'étape d'incubation enzymatique.

2.8 Conclusions

Ces premières études sur des sondes simples brin nous ont permis de mettre au point les conditions de greffage par chimie click. Nous avons ainsi constaté que cette chimie nous permettait de greffer spécifiquement, de manière covalente, des oligonucléotides simple brin contenant une fonction alcyne. De plus, nous avons montré que les sondes ainsi immobilisées sont fonctionnelles pour la formation d'un double brin. Nous avons également démontré qu'une enzyme, en l'occurrence la Fpg, est fonctionnelle sur un tel biocapteur. Nous avons, néanmoins, constaté que le modèle des oligonucléotides choisi n'était pas le mieux adapté pour détecter des activités de réparation de lésions déstabilisantes. Au cours du chapitre suivant, nous verrons que nous avons utilisé un nouveau concept de sondes qui semble plus adéquat pour ces applications.

Chapitre 3

Développement des sondes Hairpins sur support pour la détection d'activités de réparation de l'ADN

Sommaire

3.1	Biopuce à hairpins pour la détection d'activités de réparation de la BER	83
3.1.1	Conception des sondes et de la biopuce	83
3.1.2	Principe de la biopuce	92
3.1.3	Validation de la biopuce à ADN ciblant la BER	93
3.1.4	Limitations et essais d'amélioration du système	97
3.1.5	Applications à l'étude d'inhibiteurs de la réparation	109
3.2	Biopuce à sondes hairpins pour détecter la réparation des bases alkylées	114
3.2.1	Activité de l'Alkyladénine ADN-glycosylase	115
3.2.2	Détection de l'activité de la O ⁶ -méthylguanine ADN-méthyle transférase	126
3.3	Conclusions	134

Un oligonucléotide en forme d'épingle à cheveux (couramment appelé "hairpin") est constitué de deux parties : la première, nommée "tige", est une séquence auto-complémentaire, et la seconde partie, appelée "boucle", relie les deux extrémités de la tige (figure (3.1)). Cette structure présente l'avantage de ne pas nécessiter une étape supplémentaire d'hybridation avec la séquence complémentaire. Ainsi cette molécule unique possède une meilleure stabilité, en terme d'hybridation, que les duplex formés de deux oligonucléotides.

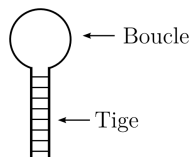


Figure 3.1 – Représentation schématique d'un oligonucléotide en forme d'hairpin.

Cette configuration est souvent utilisée avec un fluorophore à une extrémité de la séquence et un quencheur à l'autre extrémité, on parle alors de "molecular beacon". Lorsqu'une molecular beacon se trouve en position fermée celle-ci n'émet pas de fluorescence du fait de la proximité entre le quencheur et le fluorophore. Ces structures sont fréquemment utilisées pour détecter des hybridations [Wang *et al.*, 2009b, Goel *et al.*, 2005]. Pour ce type d'application, l'hybridation se fait au niveau de la boucle forçant ainsi l'éloignement du quencheur et du fluorophore qui émet alors un signal de fluorescence (figure (3.2)). Dans ce cas, la séquence est choisie de telle sorte que la tige présente une interaction faible pouvant s'ouvrir lors de l'hybridation de la cible sur la boucle. Ces molecular beacons ont notamment été appliquées pour le suivi de PCR en temps réel [Tyagi et Kramer, 1996].

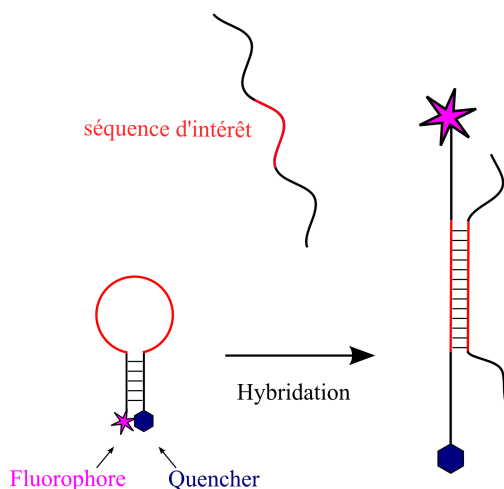


Figure 3.2 – Principe de la détection d'une hybridation par molecular beacon.

Plus récemment ces oligonucléotides ont été utilisés pour détecter des interactions ADN-protéines [Li *et al.*, 2000b, Belon et Frick, 2008, Gong *et al.*, 2009] et également des activités enzymatiques induisant une coupure d'ADN [Li *et al.*, 2000a, Maksimenko *et al.*, 2004, Matsumoto *et al.*, 2010]. Il a été démontré que ces structures, du fait de la présence de la boucle, du fluorophore et du quencheur, apportaient une protection contre la dégradation enzymatique, par des nucléases, pouvant se produire lors de l'incubation avec des extraits cellulaires [Hamann *et al.*, 2009].

De plus, au laboratoire, ces configurations ont été utilisées pour détecter des activités de réparation de l'ADN en solution [Chollat-Namy, 2006, Chollat-Namy *et al.*, 2005]. Nous avons donc choisi d'adopter cette configuration, plus stable que les duplex présentés dans le chapitre précédent, en vue de réaliser une puce pour la détection de certaines activités de réparation de l'ADN. Cette molécule unique devrait nous permettre d'obtenir une meilleure reproductibilité des signaux.

3.1 Biopuce à hairpins pour la détection d'activités de réparation de la BER

3.1.1 Conception des sondes et de la biopuce

Tout d'abord, de manière très générale, la biopuce est divisée en plusieurs blocs identiques (12 ou 24 selon les manipulations) contenant les sondes spottées. Ainsi sur chaque blocs les sondes sont déposées avec un robot spotteur en plusieurs répliquats (figure (3.3)). Ainsi, sur une même lame, un bloc pourra être incubé avec une enzyme 1, un autre avec une enzyme 2 etc...

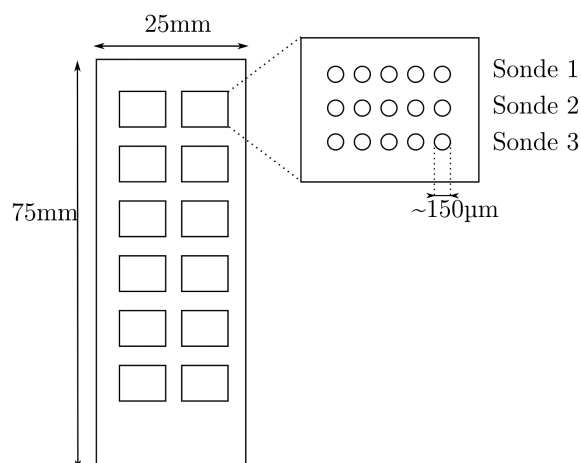


Figure 3.3 – Représentation schématique de la biopuce.

3.1.1.1 Choix de la configuration

Au laboratoire, différents essais ont été menés auparavant avec des hairpins quenchées pour détecter des activités de réparation de l'ADN. Dans ces études, un fluorophore (la fluorescéine), un quencheur (le dabcyI) et différentes lésions ont été introduits dans la séquence des sondes. Dans sa configuration initiale, la sonde en hairpin se trouve sous forme fermée de telle sorte que le fluorophore est quenché. Les deux premières étapes de réparation de la lésion par la voie de la BER sont l'excision de la base et l'incision du lien phosphodiester. Ainsi, ces étapes conduisent, sur ces sondes, à libérer le quencheur de la structure et à l'éloigner du fluorophore, qui fluoresce alors (figure (3.4)).

Nous avons donc, dans un premier temps, choisi cette configuration de “sondes quenchées” en vue de réaliser les premières biopuces pour détecter les activités de réparation de la BER.

Afin de vérifier l'efficacité du “quenching” sur un support solide, nous avons conçu deux sondes hairpins, non-lésées, possédant le site de restriction de l'enzyme *Pst*I (séquence en gras

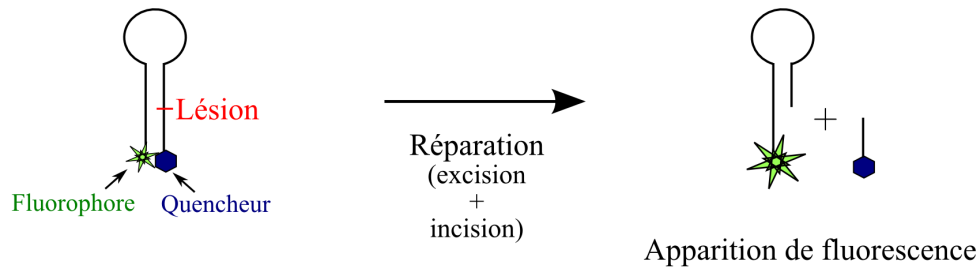


Figure 3.4 – Principe de la sonde hairpin en configuration quenchée pour détecter les activités de réparation de la BER.

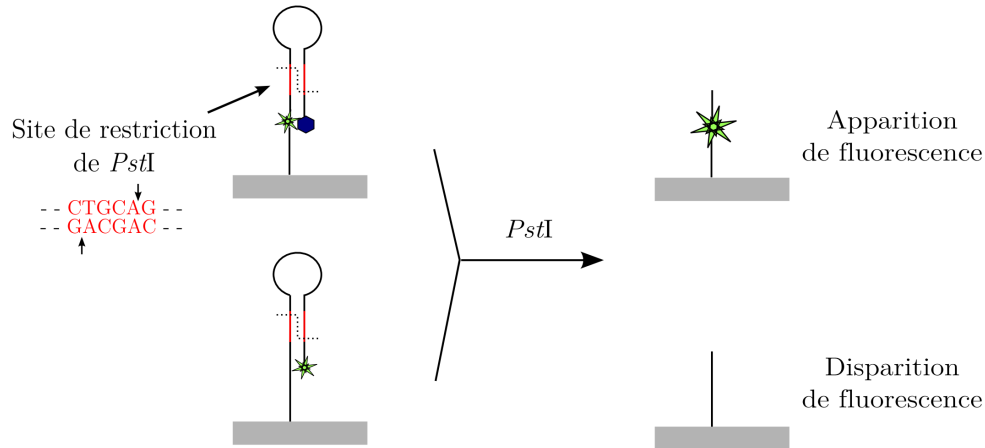


Figure 3.5 – Représentation schématique des signaux attendus après incubation des deux hairpins avec l'enzyme de restriction *PstI*.

dans le tableau (3.1), les flèches présentes sur la figure (3.5) indiquent le site de coupure par *PstI*). La première séquence, dite “quenchée”, possède un fluorophore et un quencheur afin de produire une apparition de fluorescence après coupure enzymatique. La seconde configuration, dite “fluorescente”, ne contient pas de quencheur, ce qui conduira à une disparition de fluorescence (figure (3.5)).

Nous avons choisi d'utiliser la cyanine 3 (cy3) comme fluorophore car celle-ci est moins sensible au photoblanchiment et au pH que la fluoréscéine. Nous avons utilisé le dabcyI comme quencheur qui est considéré comme un quencheur universel [Tyagi *et al.*, 1998]. Dans notre configuration, le quenching est assuré par phénomène de quenching de contact. Ce mode de quenching se produit lorsque le donneur de fluorescence et l'accepteur sont très proches ($<20 \text{ \AA}$) [Marras *et al.*, 2002]. Lorsque, par contre, le donneur et l'accepteur sont séparés par une distance entre 20-100 \AA , le

Hairpin	Séquence (5'→3')
HP <i>PstI</i> quenchée	X-TTT TTT cy3 TGA ACT GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA dabcyI
HP <i>PstI</i> fluorescente	X-TTT TTT TGA ACT GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA cy3 T

Tableau 3.1 – Séquences des sondes hairpins utilisées pour les premiers tests de quenching sur lame, où X est le nucléotide dU-propargyle.

quenching se fait par transfert de fluorescence (FRET). Une étude a été menée pour mesurer l’efficacité de quenching pour plusieurs couples donneur/accepteur lors de la formation de duplex d’oligonucléotides [Marras *et al.*, 2002]. Il a ainsi été montré que le dabcyI avait une efficacité de quenching de contact de 94 % du cy3 dans une configuration de duplex où le fluorophore et le quenceur sont “appariés”.

Synthèse des sondes

Nous avons donc, dans un premier temps, synthétisé ces nouvelles sondes en utilisant des monomères phosphoramidites commerciaux (figure (3.6)). Nous les avons ensuite purifiées. La purification de ces oligonucléotides est plus délicate que pour les sondes précédentes. En effet, ces sondes sont beaucoup plus longues avec plusieurs modifications ce qui diminue le rendement final de synthèse. De plus, pour ces tailles d’oligonucléotides, la purification par la méthode précédemment utilisée est moins résolutive. Nous avons donc procédé en deux étapes : une première purification des hairpins tritylées par HPLC en phase inverse (r-HPLC) suivant un gradient linéaire d’acétonitrile dans du tampon acétate de triéthylammonium (TEAA) (10 mM). Nous avons alors procédé à une seconde purification par r-HPLC des hairpins tritylées avec détritylation en ligne (voir chapitre 5 page 175).

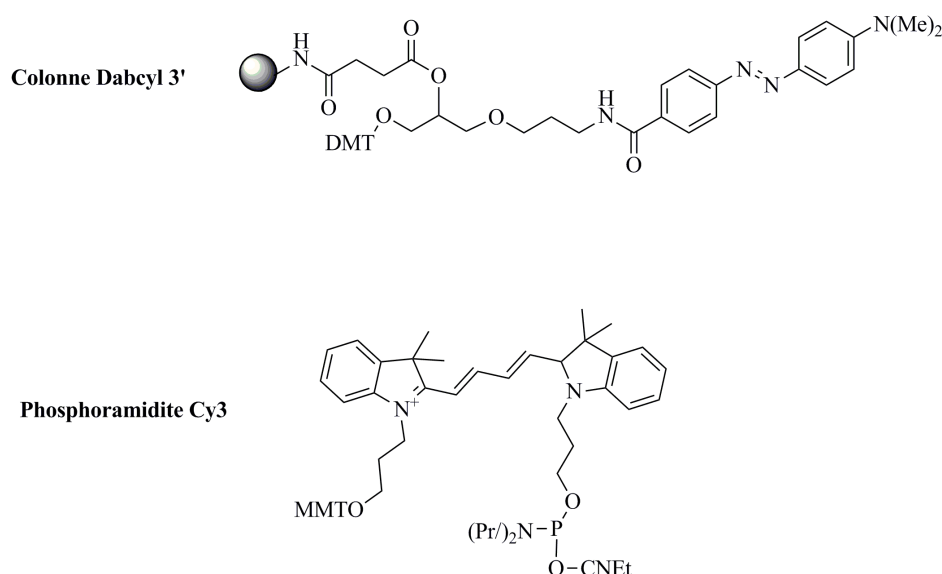
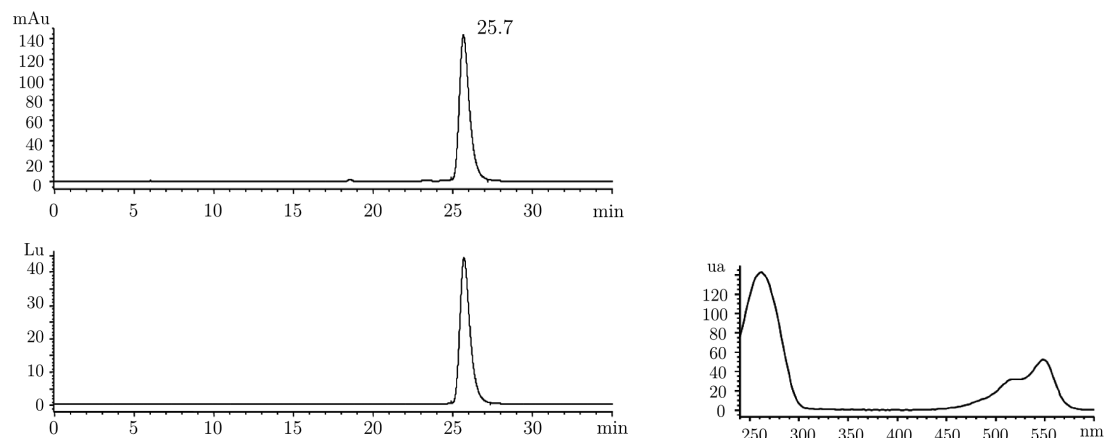


Figure 3.6 – Structures chimiques des synthons phosphoramidites utilisés pour l’incorporation du DabcyI et du Cy3.

La pureté de ces oligonucléotides a ensuite été analysée par r-HPLC analytique avec une détection UV à 260 nm et une détection en fluorescence à la longueur d’onde d’émission du cy3 (excitation à 546 nm et émission à 563 nm) (figures (3.7) et (3.8)). De plus, pour l’hairpin quenchée nous avons ajouté une détection en absorbance à 453 nm correspondant à la longueur d’onde d’absorption du dabcyI.

Pour l’hairpin fluorescente, un seul composé est élué à 25,7 min qui est à la fois détecté par UV à 260 nm et en fluorescence. Ceci confirme la pureté de la sonde et la présence du fluorophore



(a) Profil chromatographique obtenu par r-HPLC (colonne C18 300 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm, gradient 0-22 % acétonitrile dans tampon TEAA 10 mM, 35 minutes) : détection à 260 nm (en haut) et en fluorescence (en bas, excitation : 546 nm, émission : 563 nm).

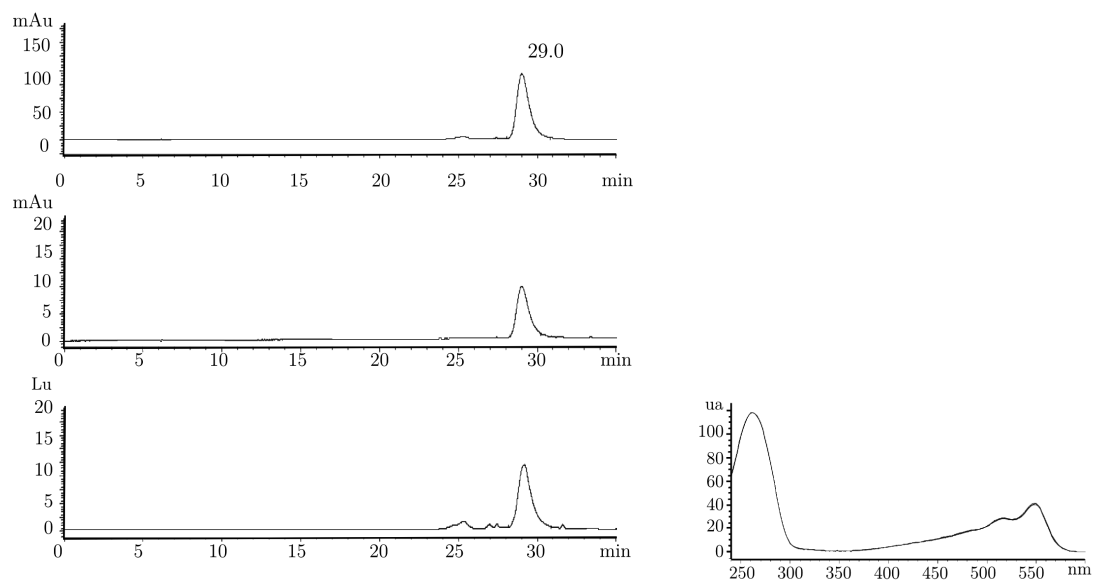
(b) Spectre d'absorbance UV-visible du composé élué à 25,7 min en HPLC couplée à une détection UV-visible et fluorescente.

Figure 3.7 – Analyse de l'hairpin *PstI* fluorescente par HPLC, couplée à une détection UV-visible et fluorescente.

sur le produit purifié. De même, pour l'hairpin quenchée, un seul composé est élué à 29 min, détecté à la fois en absorbance, à 260 nm et 453 nm, et en fluorescence. Ceci montre la pureté de cet oligonucléotide et indique la présence du dabcy1 et du cy3.

Il est à noter que le temps de rétention de l'hairpin quenchée, est plus élevé que celui de l'hairpin fluorescente. Cette sonde se distingue de l'autre par son groupement dabcy1 ce qui lui confère une plus grande hydrophobicité et ainsi une meilleure affinité pour la colonne C18 et conduit à une élution plus tardive. De plus, nous remarquons que, pour l'hairpin fluorescente, l'intensité du signal UV est 3,5 fois plus intense (en unité arbitraire) que l'intensité du signal fluorescent, alors qu'il est 10 fois plus intense pour l'hairpin quenchée. Dans le cas de l'hairpin quenchée, les conditions d'élution sont telles que la sonde n'est pas complètement appariée, ce qui explique que l'on obtient un signal en fluorescence bien que celui-ci soit faible.

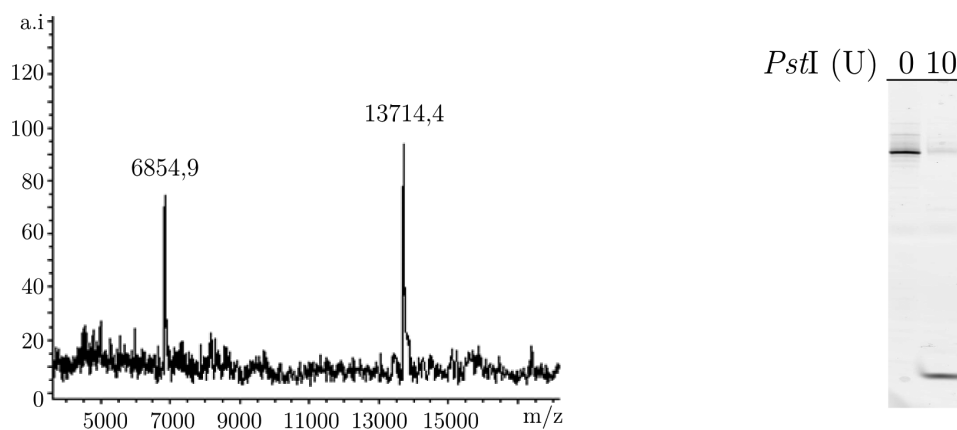
Le système chromatographique utilisé nous a également permis de réaliser un spectre d'absorption UV-visible du produit élué en HPLC. Cette mesure nous permet de vérifier la présence du cy3 (signal d'absorbance à 546 nm) et, dans le cas de l'hairpin quenchée, du dabcy1 (signal d'absorbance à 453 nm), sans tenir compte du quenching de fluorescence. Ces oligonucléotides ont également été analysés par spectrométrie de masse et gel d'électrophorèse (PAGE). Enfin, leur fonctionnalité a été vérifiée par électrophorèse dénaturante sur gel d'acrylamide (PAGE) après incubation avec l'enzyme *PstI* (figure (3.9) pour l'hairpin fluorescente).



(a) Profil chromatographique obtenu par r-HPLC (colonne C18 300 Å, 5 µm, 250 × 4,6 mm, gradient 0-22 % acétonitrile dans tampon TEAA 10 mM, 35 minutes) : détection UV à 260 nm (en haut) et à 453 nm (au milieu) et en fluorescence (en bas, excitation : 546 nm, émission : 563 nm).

(b) Spectre d'absorbance UV-visible du composé élué à 29 min en HPLC.

Figure 3.8 – Analyse de l'hairpin PstI quenchée par HPLC, couplée à une détection UV-visible et fluorescente.



(a) Caractérisation de l'hairpin PstI fluorescente par MALDI-TOF (mode linéaire négatif) ($[M-H]^-$ attendue : 13708,2 g/mol, $[M-H]^-$ mesurée : 13714,4 g/mol).

(b) Validation de la pureté et de la fonctionnalité l'hairpin PstI fluorescente par PAGE (gel d'acrylamide 20 %, 7 M urée).

Figure 3.9 – Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF et par PAGE dénaturant de l'hairpin PstI fluorescente.

Immobilisation des sondes et choix de la configuration à adopter

Les deux sondes ont ensuite été immobilisées, par chimie click, sur les lames fonctionnalisées selon la méthode mise au point précédemment.

Afin de s'assurer de la bonne fermeture de la structure des sondes harpins, le protocole a été adapté d'après [Strohsahl *et al.*, 2007]. Ainsi, après immobilisation des oligonucléotides sur les lames, ces dernières ont été plongées dans de l'eau bouillante et incubées avec du tampon d'hybridation 1 h à 50 °C. Nous avons ensuite comparé les intensités de fluorescence pour ces deux sondes. Comme l'indique la figure (3.10), les intensités de fluorescence des deux sondes sont quasiment identiques. Le signal de fluorescence de la sonde quenchée est d'environ 80 % de celui de la sonde fluorescente. Cette forte intensité de fluorescence peut être due à une mauvaise formation du duplex malgré les précautions employées.

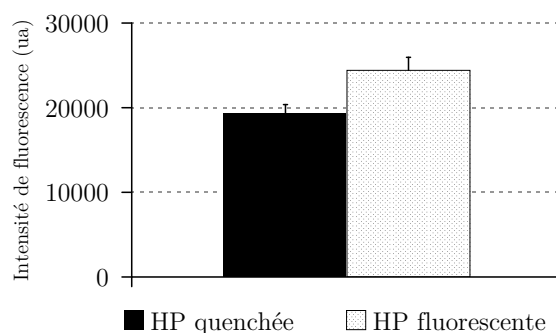


Figure 3.10 – Comparaison des intensités de fluorescence des sondes hairpins “HP quenchée” et “HP fluorescente” après immobilisation sur lame de verre.

Pour tester cette hypothèse, nous avons incubé les lames contenant les deux hairpins avec une solution contenant l'enzyme de restriction *PstI*. L'enzyme de restriction ne coupera le site présent dans les deux hairpins uniquement si celles-ci se trouvent sous forme double-brin. La coupure par *PstI* de l'hairpin initialement quenchée devrait induire une augmentation de fluorescence alors que celle de l'hairpin initialement fluorescente devrait induire une disparition de fluorescence (figure 3.5 page 84).

Comme l'indique la figure (3.11a), nous obtenons bien une diminution de la fluorescence de l'hairpin fluorescente à hauteur d'environ 56 % par rapport à l'hairpin incubée uniquement avec du tampon enzymatique. Pour l'hairpin quenchée nous constatons une très légère augmentation de fluorescence (environ 18 %). Ce résultat nous indique donc que, sans la présence du quencheur, l'hairpin est bien sous forme de duplex et accessible à l'enzyme, au moins à hauteur de 56 % des sondes présentes sur la surface. Ainsi approximativement 44 % des sondes ne sont pas fonctionnelles pour cette coupure enzymatique. Il est possible que cette fraction de sondes ne soit pas sous forme double-brin ce qui peut limiter l'extinction de la sonde HP quenchée et ainsi expliquer le signal obtenu. Il est connu que les sondes molecular beacons utilisées pour des détectations d'hybridation sont moins performantes lorsqu'elles sont immobilisées sur un support solide

que lorsqu’elles sont en solution. En effet, l’augmentation de fluorescence après hybridation n’est plus que de 2 à 5 fois contre jusqu’à 25 fois en solution [Martinez *et al.*, 2009, Yao et Tan, 2004]. Il semble que cela soit dû à une interaction de la sonde avec la surface résultant en une déstabilisation de la structure de la sonde et ainsi à un moins bon quenching initial. Il est également connu que si la densité des sondes de type “molecular beacon” est trop importante, cela génère une gêne stérique et limite la formation du duplex [Wang *et al.*, 2005].

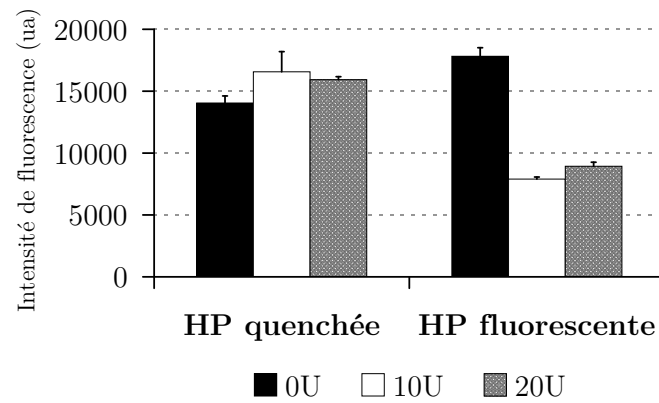
Afin de vérifier si une partie des sondes ne s’absorbe pas sur la surface, nous avons également incubé certains blocs de la lame avec la nucléase P1 (NP1). Cette nucléase, non séquence-spécifique et qui agit sur l’ADN simple brin et double brin, hydrolyse les liens phosphates en 3’ et génère des nucléosides 5’-monophosphate. Comme nous pouvons l’observer sur la figure (3.11b), dans les deux cas la fluorescence diminue très fortement après incubation avec 1 unité de NP1. En considérant les signaux obtenus après incubation avec uniquement du tampon enzymatique comme étant 100 % du signal et en les comparant avec ceux obtenus après incubation avec la nucléase, nous trouvons environ 78 % de diminution du signal dans le cas de l’HP quenchée et 87 % dans le cas de l’HP fluorescente. Il semble donc qu’une partie mineure des sondes est susceptible de rester absorbée sur la surface. Nous remarquons que l’intensité de fluorescence résiduelle est légèrement plus élevée dans le cas de l’HP quenchée. Cette légère différence peut s’expliquer par la position du fluorophore qui est, dans le cas de l’HP fluorescente, plus propice à être relarguée du support. En effet, dès que la nucléase incise l’oligonucléotide dans cette configuration, le marqueur cy3 passe en solution. Dans le cas de l’HP quenchée, le fluorophore est du côté de la séquence qui est directement liée à la surface. Il faut donc que la nucléase incise la séquence entre le support et le fluorophore pour que celui-ci soit détaché de la lame.

Etant donné les résultats obtenus, nous avons préféré nous concentrer dans un premier temps sur la configuration “Hairpin fluorescente”, pour laquelle on observera une disparition de fluorescence lors d’une coupure enzymatique, afin de développer le biocapteur destiné à détecter les activités de réparation de l’ADN.

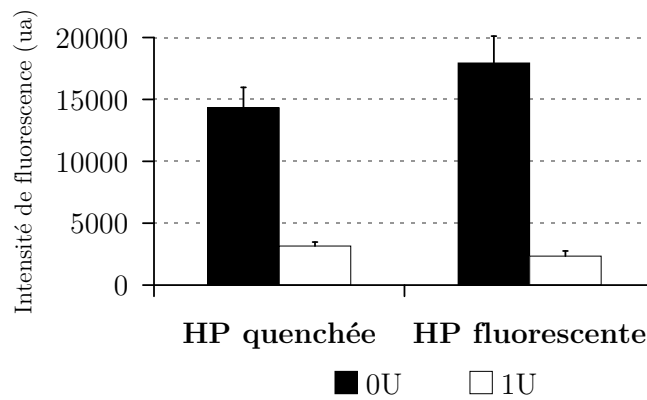
3.1.1.2 Séquences des sondes nucléiques

Nous nous sommes intéressés à la détection des deux premières étapes de la réparation par excision de base. Rappelons que la première étape est l’étape d’excision de la base endommagée par une ADN-glycosylase et que la deuxième étape est l’incision du lien phosphodiester, soit par une glycosylase bi-fonctionnelle, soit par une AP-endonucléase. Afin de visualiser ces deux étapes nous avons donc choisi des substrats reconnus par une glycosylase mono-fonctionnelle (première étape) et par une AP-endonucléase (deuxième étape). Nous souhaitons pouvoir mesurer ces activités dans des extraits cellulaires. Or, il est connu que certaines enzymes sont plus aisément détectables que d’autres dans ces conditions [Kreklaue *et al.*, 2001]. De plus, nous avons vu que l’activité enzymatique de l’AP-endonucléase humaine, Ape1, est liée à certains cancers et que cette dernière est une des cibles privilégiées d’inhibiteurs développés pour améliorer la réponse aux traitements chimiothérapeutiques (voir Chapitre 1, paragraphe 1.7.1 page 41).

C’est pourquoi nous avons incorporé, dans une première séquence substrat, une uracile et dans une deuxième séquence un analogue de site abasique, le tétrahydrofurane (THF) que nous avons déjà utilisé (voir paragraphe 2.7.2 page 77). Nous avons également conservé la sonde HP fluorescente présentée plus haut qui nous servira ici de témoin négatif pour les activités de



(a) Après incubation avec *PstI*.



(b) Après incubation avec la Nucléase P1.

Figure 3.11 – Comparaison des intensités de fluorescence des deux sondes hairpins après incubation avec l'enzyme de restriction *PstI* (a) et la nucléase P1 (b).

Hairpin	Séquence (5'→3')
HP PstI	X-TTT TTT TGA ACT GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
HP Uracile (U : A)	X-TTT TTT TGA ACU GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
HP THF (THF : A)	X-TTT TTT TGA AC(THF) GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T

Tableau 3.2 – Séquences des sondes hairpins utilisées pour la détection d’activités de la BER, où X est le nucléotide dU-propargyle.

réparation ciblées. Cette sonde, qui contient le site de restriction de l’enzyme *PstI* sera nommée “HP PstI”. Les deux substrats, THF et uracile, ont été insérés dans le site de restriction de *PstI* de cette séquence (tableau (3.2)).

La présence de la base uracile dans l’ADN peut être issue de deux mécanismes (voir paragraphe 1.2.1.2 page 8). En effet, cette base peut tout d’abord être générée par la désamination de la cytosine. Si cette désamination se produit au sein de l’ADN double-brin, cela conduit à l’appariement U : G, tandis que si elle se produit dans l’ADN simple brin, cela conduit à l’appariement U : A. Cette base peut également être introduite dans l’ADN par incorporation de dUTP au lieu de dTTP par les ADN polymérases, ce qui mène à l’appariement U : A. Nous avons choisi d’utiliser un oligonucléotide contenant la base uracile appariée à une adénine. Cette lésion est reconnue majoritairement par la glycosylase mono-fonctionnelle UNG (voir paragraphe 1.5.2.1 page 29). L’excision de l’uracile mène à la formation d’un site abasique qui est alors incisé par l’AP-endonucléase. Cet oligonucléotide substrat nous permet donc de cibler la première et la deuxième étape de la BER, tandis que le substrat THF, reconnu et incisé directement par l’AP-endonucléase, nous permet de cibler la deuxième étape de cette voie de réparation.

3.1.1.3 Cinétique d’immobilisation des sondes nucléiques

Nous avons, dans un premier temps, réalisé une cinétique d’immobilisation des sondes auto-complémentaires alcyne sur les lames azotures afin de s’assurer des conditions optimales de greffage. Pour cela nous avons spotté les sondes à différents temps sur une même lame. Puis nous avons arrêté la réaction 8 h après le premier spotting.

Dans ces conditions, la réaction semble être maximale pour les trois sondes après environ 7 h d’immobilisation (figure (3.12)). Il est intéressant de noter qu’une fois la réaction complète nous obtenons une très bonne reproductibilité du signal avec un coefficient de variation (CV) de l’ordre de 7 % sur 10 réplicats (tableau (3.3)).

	1h	2h10	4h05	6h10	8h10
Coefficients de variation (%)	27,3	14,4	7,6	7,4	5,2

Tableau 3.3 – Coefficients de variation du signal de fluorescence obtenus pour l’HP PstI en fonction de la durée d’immobilisation.

Pour des raisons pratiques, nous garderons par la suite notre protocole standard qui consiste

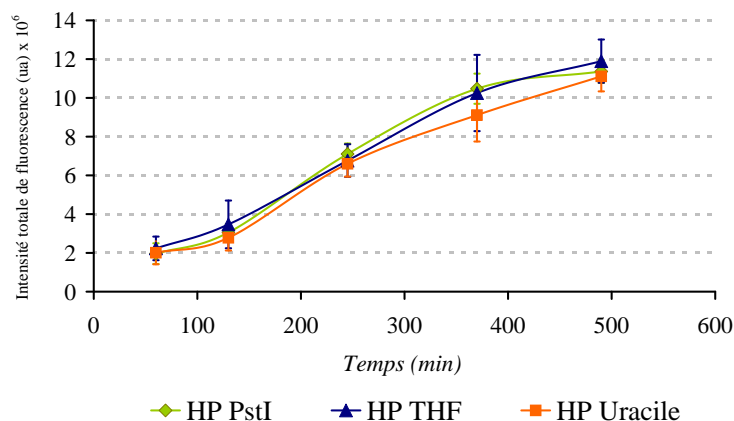


Figure 3.12 – Cinétique d'immobilisation des sondes hairpins sur les lames azotures.

à spotter les sondes une fin d'après-midi et arrêter la réaction le lendemain matin. Ce temps d'immobilisation, d'une nuit, correspond à ce qui est utilisé classiquement pour cette chimie de greffage [Lim *et al.*, 2008, Seo *et al.*, 2005]. En solution, cette réaction est complète après 6 à 36 heures à température ambiante, selon les réactifs et protocoles utilisés [Rostovtsev *et al.*, 2002, Bouillon *et al.*, 2006]. Il a été montré que ces temps de réaction pouvaient être diminués de manière significative notamment par l'utilisation des micro-ondes [Bouillon *et al.*, 2006]. Nous n'avons néanmoins pas cherché à réduire ce temps de réaction pour des raisons de commodité expérimentale de réalisation de la manipulation.

3.1.2 Principe de la biopuce

L'objectif de cette puce est de pouvoir détecter des activités de réparation de l'ADN de la voie de la BER, plus précisément celles de l'uracile N-glycosylase (UNG) et de l'AP-endonucléase Ape1. Nous avons donc fonctionnalisé la surface des lames avec les sondes présentées plus haut.

Le principe est similaire à celui présenté au chapitre précédent. Initialement, les trois hairpins spottés sur les lames sont fluorescents. La détection de l'activité de réparation repose sur l'étape de coupure du squelette phosphate qui permet de libérer le fluorophore de la lame. Ainsi, il est possible de détecter l'activité de glycosylases bi-fonctionnelles, d'AP-endonucléases, d'enzymes de restriction, ou toute autre enzyme induisant une coupure du lien phosphodiester. Néanmoins, pour l'activité de glycosylases mono-fonctionnelles, il est nécessaire d'ajouter un "révélateur" puisque celles-ci excisent uniquement la base endommagée. Dans les cellules, l'étape d'excision de la base est immédiatement suivie de l'incision du lien phosphodiester par une AP-endonucléase. Lorsque nous voulons détecter l'activité de glycosylases mono-fonctionnelles nous ajoutons donc une AP-endonucléase dans le milieu réactionnel pour révéler leur action. Ainsi, lorsque nous incubons les lames fonctionnalisées avec un extrait cellulaire ou des enzymes purifiées nous observons une diminution de fluorescence, au niveau des sondes substrats, proportionnelle aux activités d'excision/incision (figure (3.13)).

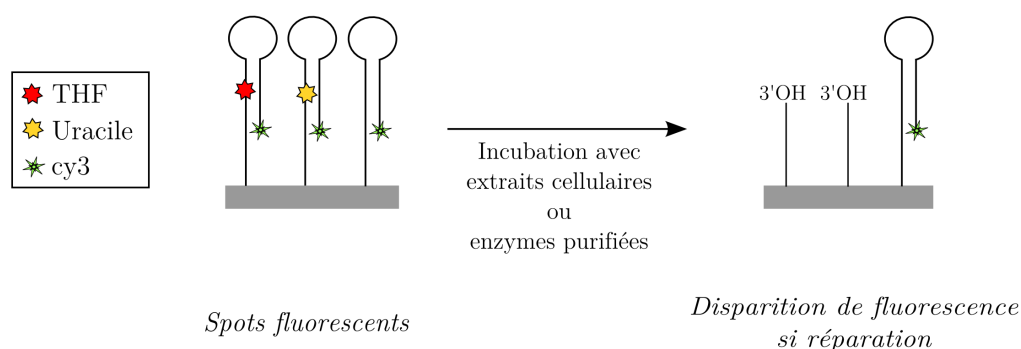


Figure 3.13 – Représentation schématique du principe de la biopuce à ADN pour détecter les activités de la BER (UNG et Ape1 dans ce cas) à l'aide de sondes hairpins substrats.

3.1.3 Validation de la biopuce à ADN ciblant la BER

Une fois les sondes immobilisées sur les lames, nous avons vérifié leur fonctionnalité pour la détection des activités de la glycosylase UNG et l'AP-endonucléase humaine Ape1.

3.1.3.1 Détection des activités de la BER à partir d'enzymes purifiées

Nous avons tout d'abord testé la biopuce avec des enzymes purifiées reconnaissant les lésions introduites sur la puce. Ainsi, une première expérience a consisté à incuber les lames fonctionnalisées avec une gamme d'AP-endonucléase humaine, Ape1. Nous avons ainsi pu établir un pourcentage de coupure suivant le calcul préalablement expliqué au chapitre précédent (voir équation 2.1 page 75). Comme l'indique la figure (3.14), nous observons une coupure spécifique de la sonde HP THF par rapport à la sonde HP Uracile. De plus, le taux de coupure de la sonde HP THF dépend de la quantité d'Ape1. Le résultat est donc en accord avec ce que nous attendions puisque le THF, contrairement à l'uracile, est un substrat connu pour cette enzyme.

Nous avons ensuite souhaité mettre en évidence la réparation de l'uracile par UNG sur la biopuce. UNG étant une glycosylase mono-fonctionnelle, excisant la base uracile et générant un site abasique, nous avons utilisé Ape1 comme révélateur de son activité. Pour cela nous nous

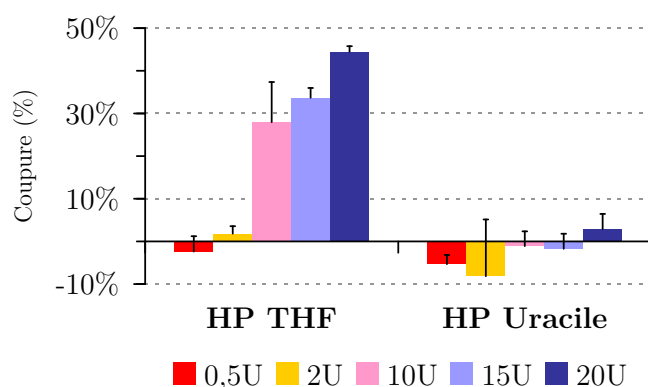


Figure 3.14 – Pourcentages de coupure obtenus sur lame après incubation (1 h, 37 °C) avec une gamme d'Ape1.

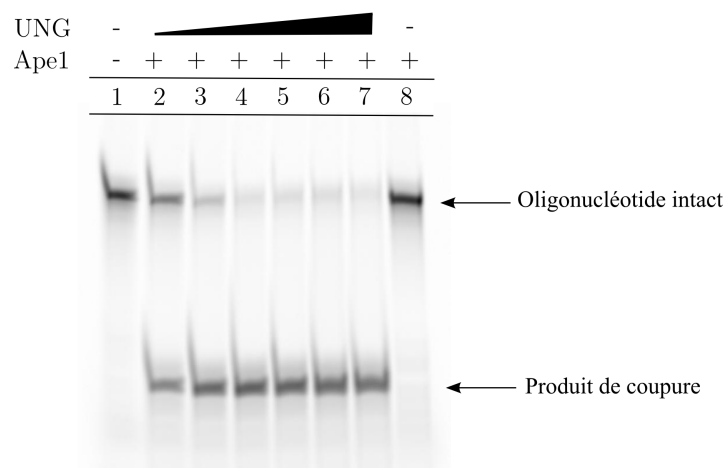


Figure 3.15 – Validation par analyse PAGE dénaturante de la réparation de la sonde HP Uracile (15 pmoles de sonde hairpin, 20 μ L ; UNG : 0.1 U, 0.5 U, 1 U, 2 U, 5 U, 10 U ; Ape1 10 U).

sommes placés à une quantité fixe d'Ape1 et nous avons fait varier la quantité d'UNG.

Nous avons tout d'abord réalisé cette expérience en utilisant une analyse PAGE afin de vérifier la fonctionnalité de la sonde HP Uracile et la compatibilité de couple d'enzymes (tampons, temps, quantité d'enzymes). Pour cela nous avons incubé la sonde HP Uracile avec les deux enzymes dans le tampon enzymatique d'Ape1. Ce tampon a été choisi car Ape1 a besoin de Mg^{2+} pour être active et que ce cation n'est pas présent dans le tampon commercial de la glycosylase UNG. Nous avons ainsi pu observer une dose dépendance de la coupure de cette sonde en fonction de la quantité d'UNG, avec un maximum atteint pour 1 unité d'UNG (piste 3 du gel présenté dans la figure (3.15)). Nous avons également vérifié que la présence seule d'Ape1 n'induit pas une coupure de la sonde (piste 8, figure (3.15)). Cela montre donc que l'enzyme UNG est bien active dans ces conditions de réaction, et valide l'utilisation de Ape1 comme révélateur de l'activité d'UNG.

Nous avons ensuite réalisé la même expérience sur lame. Dans ce cas, nous observons également une coupure de la sonde HP uracile dépendante de la quantité d'UNG, avec un plateau qui est atteint entre 1 et 2 unités d'UNG (figure (3.16)). La sonde HP THF est, quant à elle, coupée de manière similaire quelle que soit la quantité d'UNG présente. Ceci est conforme à ce que nous attendions puisque cette sonde contient un analogue de site abasique qui n'est pas reconnu par UNG mais directement par Ape1. La quantité d'Ape1 étant fixe, il est normal d'observer un taux de coupure identique pour cette sonde quelle que soit la quantité d'UNG utilisée.

Ainsi, nous avons montré que la biopuce développée ici est utilisable pour détecter des activités de réparation de l'ADN par la voie BER à partir d'enzymes purifiées.

3.1.3.2 Détection des activités de la BER à partir d'extraits cellulaires

Nous avons ensuite appliqué ce biocapteur à la détection de ces activités de réparation au sein d'un extrait cellulaire. Pour cela nous avons incubé la biopuce avec un extrait nucléaire de cellules HeLa commercial. Nous avons au préalable réalisé une analyse par PAGE de la coupure des sondes par cet extrait. Les résultats obtenus montrent une coupure maximale de la sonde HP Uracile pour une concentration en extrait nucléaire HeLa pour 500 μ g/mL (figure (3.17)).

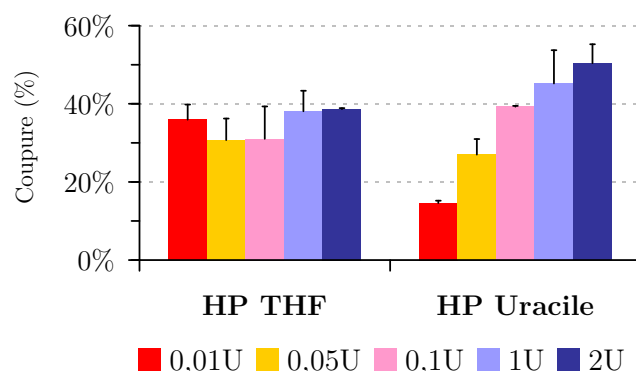


Figure 3.16 – Pourcentages de coupure obtenus sur lame après incubation (1 h, 37 °C) avec une gamme d'UNG en présence d'Ape1 (20 U).

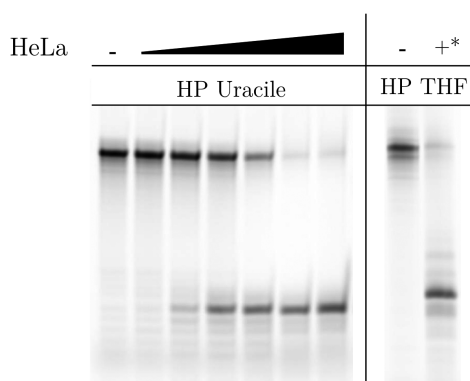


Figure 3.17 – Analyse par PAGE dénaturante de la coupure des sondes HP Uracile et HP THF en solution par un extrait nucléaire HeLa (15 pmoles d'hairpin, 20 µL ; extrait HeLa nucléaire : 0, 5, 25, 50, 250, 500, 1000 µg/mL ; “+*” = 500 µg/mL).

Nous voulions nous assurer de pouvoir détecter une coupure sur la biopuce, c'est pourquoi nous avons choisi deux concentrations hautes en extraits pour l'incubation : 200 µg/mL, et 500 µg/mL. Dans ces conditions, nous avons observé une coupure spécifique des deux sondes substrats (figure (3.18)). En effet, aucune dégradation de la sonde témoin, HP PstI, n'a été constatée (figure (3.18a)). De plus, nous obtenons des pourcentages de coupure des sondes HP THF et HP Uracile quasi-identiques, pour les deux concentrations choisies indiquant qu'un plateau a été atteint (figure (3.18b)). Dans ces conditions, nous pouvons remarquer que la coupure de la sonde HP THF est légèrement plus faible que celle de la sonde HP Uracile. Néanmoins, des manipulations similaires réalisées par la suite sur un lot neuf d'extrait HeLa n'ont pas confirmé cet effet (voir paragraphe 3.2.1.1 page 115). Il est donc probable que ce phénomène soit uniquement dû à l'extrait utilisé ici qui apparaît moins actif que celui utilisé par la suite.

Nous avons ensuite utilisé le biocapteur pour réaliser un suivi en temps de la coupure de ces deux sondes. Pour cela, nous nous sommes placés à une concentration en extrait nucléaire HeLa de 200 µg/mL pour laquelle nous obtenions une coupure maximale, et nous avons incubé les différents blocs d'une même lame avec cette solution à différents temps. La réaction a alors été arrêtée 2 heures après la première incubation. Cette technique est néanmoins délicate à

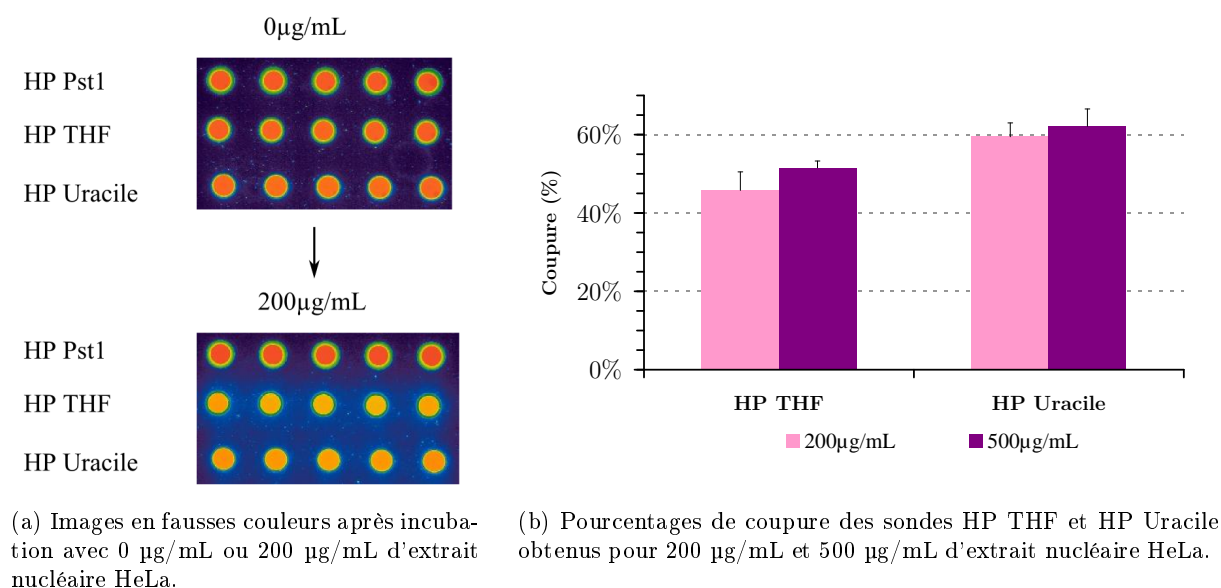


Figure 3.18 – Détection des activités d'UNG et d'Ape1 sur la biopuce à ADN après incubation (1 h, 37 °C) avec une gamme d'extrait nucléaire HeLa sur lame.

appliquer pour des mesures précises et semble peu adaptée pour mesurer des cinétiques précises. En effet, lors de cette manipulation nous avons utilisé la même solution enzymatique que nous avons déposée à différents temps. Il serait probablement préférable de ne pas laisser une solution contenant les différentes enzymes plusieurs heures avant utilisation (bien que nous ayons pris la précaution de la conserver dans la glace). De plus, la mesure précise du temps d'incubation repose sur la rapidité du dépôt de la solution sur la lame qui peut parfois se révéler délicat.

Nous avons néanmoins pu suivre au cours du temps la réparation des deux sondes substrats immobilisées sur la biopuce. Nous avons observé, dans ces conditions, des cinétiques de réaction similaires avec un taux de coupure maximal pour environ 1 h de réaction, pour les deux sondes hairpins substrats (HP THF et HP Uracile) (figure (3.19)).

A priori on pourrait penser que l'incision de la sonde HP Uracile nécessitant deux étapes (excision de la base par UNG puis incision du brin par Ape1), la coupure de cette sonde nécessiterait plus de temps que la coupure de la sonde HP THF qui, elle, ne nécessite qu'une étape. Néanmoins, dans ces conditions, nous sommes probablement en très large excès d'enzymes par rapport aux substrats. De plus, la présence d'Ape1 fonctionnelle stimule l'excision de la base uracile par UNG qui se fait alors très rapidement [Kavli *et al.*, 2002]. Ainsi l'étape limitante semble être celle de la coupure du lien phosphodiester par Ape1 qui est, a priori, identique pour la sonde HP THF et pour la sonde contenant le site abasique (sonde HP Uracile après excision de la base). Dans ces conditions, il ne semble donc pas aberrant d'observer une coupure des deux sondes à des vitesses de réaction similaires.

Nous avons donc validé ce système de biopuce à ADN pour détecter les activités de réparation d'une glycosylase mono-fonctionnelle et d'une AP-endoncléase à partir d'enzymes purifiées mais également à partir d'un extrait cellulaire. Nous avons néanmoins constaté que les pourcentages de coupure obtenus ne dépassaient pas 60 % alors que nous avons obtenu précédemment jusqu'à 90 % de coupure dans le cas des sondes en duplex (voir Chapitre 2, paragraphe 2.7.1 page 75) ou encore dans le cas de l'incubation des sondes avec la nucléase P1 (voir Chapitre 3, page 89).

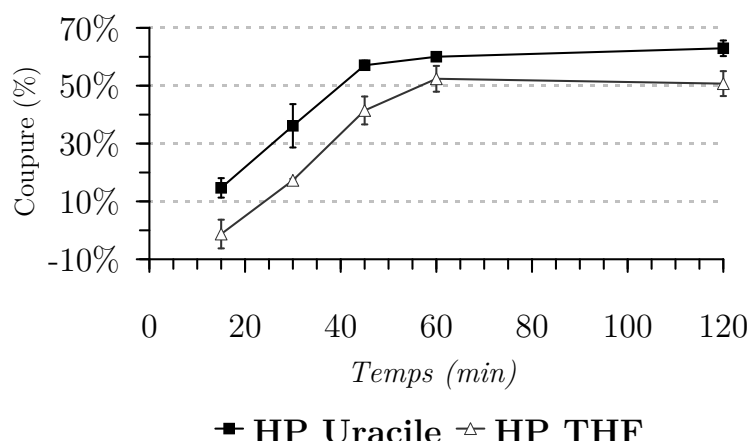


Figure 3.19 – Cinétique de coupure sur lame des sondes hairpins THF et Uracile par 200 µg/mL d'extrait nucléaire HeLa.

Nous avons donc cherché à comprendre l'origine de cette limitation et avons essayé d'améliorer le système en utilisant plusieurs approches complémentaires.

3.1.4 Limitations et essais d'amélioration du système

Au chapitre précédent, nous avons obtenu des pourcentages de coupure de l'ordre de 90 % lors de l'expérience concernant la réparation de la 8-oxoG par la glycosylase Fpg (voir paragraphe 2.7.1 page 75). Bien que dans le cas de la nouvelle biopuce nous n'ayons pas ciblé cette activité de réparation, nous nous attendions à obtenir des pourcentages de coupure similaires. En effet, quelles que soient les enzymes utilisées (*Pst*I, *Eco*RI, Ape1, UNG/Ape1), nous obtenons toujours un pourcentage de coupure plafonné à environ 60 %.

Nous avons donc cherché à comprendre la raison de cette limitation et avons essayé d'optimiser notre système en jouant sur différents paramètres. Ainsi, nous avons tout d'abord étudié les paramètres enzymatiques (température et temps), puis nous avons travaillé sur l'accessibilité des sondes.

3.1.4.1 Étude des conditions enzymatiques

Nous avons vu qu'un plateau était atteint au bout d'une heure d'incubation, ainsi il ne semble pas pertinent de modifier cette variable et nous avons conservé un temps d'incubation fixe d'une heure. Nous avons alors regardé si la température d'incubation pouvait avoir un effet sur le pourcentage de coupure. Pour cela, nous avons traité deux lames avec une gamme d'extrait HeLa à une température d'incubation de 30 °C et une autre de 37 °C. Nous n'avons cependant pas observé de différence significative entre ces deux températures (figure (3.20)). Ceci a confirmé que les paramètres d'incubation que nous utilisons sont adéquats et que le fait que nous ayons un pourcentage de coupure plafonné autour de 60 %, ne provient pas des conditions enzymatiques mais d'un autre paramètre.

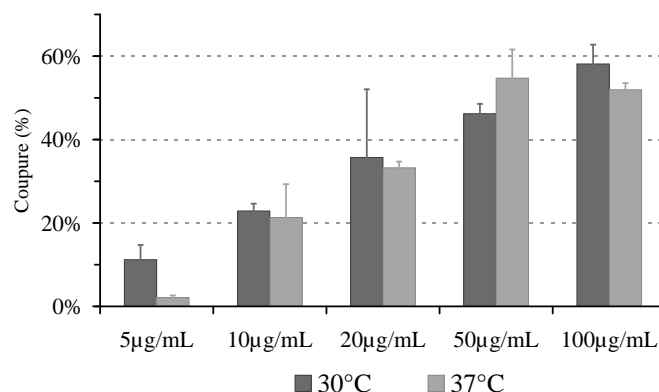


Figure 3.20 – Effet de la température d’incubation sur le pourcentage de coupure de la sonde HP Uracile par une gamme de concentration d’un extrait nucléaire de cellules HeLa.

3.1.4.2 Travail sur l’accessibilité des sondes

Nous avons ensuite émis l’hypothèse que cela pouvait provenir d’un problème d’accessibilité des sondes substrats à la surface des lames. Pour cela nous avons testé l’accessibilité “verticale”, en modifiant le linker reliant la sonde à la surface, puis nous avons testé l’accessibilité “horizontale” des sondes.

Distance reliant la sonde à la lame

Dans un premier temps nous avons essayé d’améliorer l’accessibilité “verticale” des sondes en augmentant la distance séparant la sonde de la lame. Pour cela nous avons synthétisé la sonde HP Uracile 12T se différenciant de la sonde HP Uracile par l’ajout de 6 thymidines à l’extrémité 5’ de la séquence (tableau (3.4)). Cette nouvelle sonde possède ainsi un “linker” de 12 thymidines, ce qui devrait permettre d’augmenter son accessibilité pour les enzymes. Nous avons alors comparé les taux de coupure enzymatique de ces deux sondes, sur lame. L’utilisation de cette nouvelle sonde n’a pas conduit à une augmentation du taux de coupure enzymatique maximal, ni avec les enzymes purifiées, ni avec un extrait nucléaire de cellules HeLa (figure (3.21)). Ainsi il semble que ce paramètre ne soit pas en cause dans la limitation du pourcentage de coupure que l’on observe.

Hairpin	Séquence (5'→3')
HP Uracile	X-TTT TTT TGA ACU GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
HP Uracile 12T	X-TTT TTT TTT TTT TGA ACU GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T

Tableau 3.4 – Séquences des sondes hairpins uracile contenant un linker 6T ou 12T.

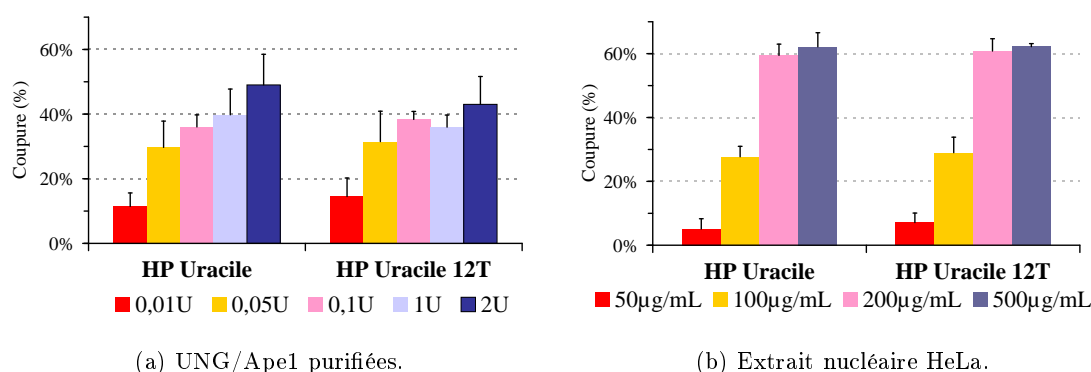


Figure 3.21 – Effet de la longueur du “linker” reliant la sonde nucléique à la lame sur la coupure enzymatique de l’uracile par une gamme d’enzyme purifiée UNG (quantité d’Ape1 fixée à 20 U) (a) et par une gamme d’extrait nucléaire HeLa (b).

Densité des sondes

Nous avons émis l’hypothèse que la faible coupure observée pouvait venir d’une trop grande densité des sondes. Nous avons dans un premier temps cherché à estimer la densité des sondes à la surface des lames afin d’évaluer si ce paramètre pouvait être la cause du phénomène observé. Puis, nous avons travaillé sur plusieurs stratégies permettant de diminuer cette densité.

Estimation de la densité

Nous avons, dans un premier temps, voulu estimer la densité des sondes à la surface des lames. Pour cela nous avons utilisé une méthode décrite par Mahajan *et al.* [Mahajan *et al.*, 2009]. Cette technique utilise une mesure de fluorescence et repose sur la comparaison des intensités obtenues pour les sondes après greffage covalent par rapport à une courbe de calibration.

Nous avons, tout d’abord, réalisé une courbe de calibration représentant l’intensité de fluorescence mesurée en fonction de la quantité de sonde déposée. Cette courbe représente le maximum de sonde que l’on peut avoir sur la surface. Pour ce faire nous déposons manuellement (0,5 µL) sur une lame, des solutions de la sonde HP PstI diluée dans de l’eau à différentes concentrations, que nous laissons sécher. Notons que nous n’avons pas, dans ce cas, utilisé les conditions de spotting habituelles (dépôt avec le robot et dilution dans du tampon de spotting), car cela ne permettait pas de sécher les spots formés, du fait du tampon de spotting. Une fois les spots secs, nous les avons quantifiés par mesure de fluorescence. Cette lame “témoin”, nous permet d’établir la courbe de calibration présentée en figure (3.22). Nous pouvons noter que la fluorescence pour la sonde HP PstI est linéaire en fonction de la quantité de sonde déposée, excepté le point pour un dépôt de 5 pmoles, soit 0,5 µL d’une solution à 10 µM. Nous pensons que cette différence est due à un problème de manipulation.

Sur une autre lame, dite “test”, des dilutions de sonde HP Pst1 (concentrations identiques à la lame “témoin”) sont déposées manuellement (0,5 µL) dans le tampon de spotting et en présence de cuivre, afin de permettre la réaction de chimie click dans des conditions similaires à celles utilisées habituellement. Nous avons laissé la réaction se produire pendant une nuit conformément au protocole établi précédemment, puis la lame a été lavée et quantifiée. Ces mesures nous permettent d’apprécier la quantité de sondes spécifiquement greffées sur la lame. Nous basant sur la

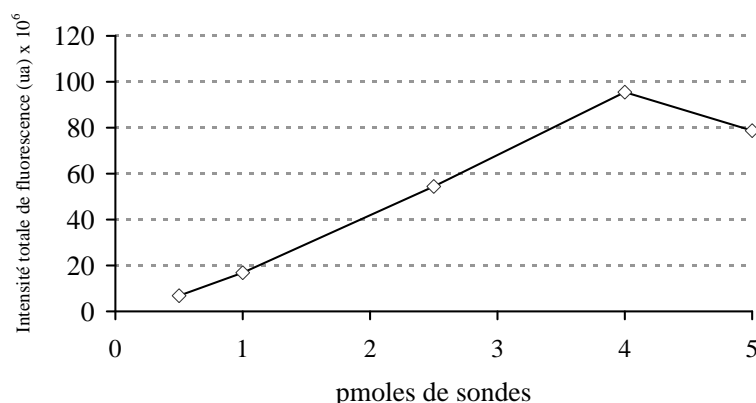


Figure 3.22 – Courbe de calibration obtenue après dépôt de 0,5 μ L des dilutions de la sonde HP PstI.

Sonde déposée		% d'immobilisation		ODN/cm ² ($\times 10^{12}$)	
Concentration	pmoles	méthode 1	méthode 2	méthode 1	méthode 2
1 μ M	0,5	1,4 %	0,9 %	1,5	1
2 μ M	1	8,3 %	7 %	5,34	4,5
5 μ M	2,5	3,9 %	4,2 %	5,6	6,1
8 μ M	4	2,1 %	2,5 %	5,9	7
10 μ M	5	2,8 %	2,2 %	8,9	7

Tableau 3.5 – Estimation de la densité de sondes HP PstI immobilisées.

courbe de calibration, à la fois à partir des points réels (méthode 1) et également en considérant la régression linéaire obtenue pour ces points en enlevant le point à 5 pmoles (méthode 2), nous avons pu établir une densité de greffage (tableau (3.5)). Les valeurs obtenues, bien qu'approximatives, nous donnent une idée de l'ordre de grandeur de la densité des sondes à la surface de la lame. A la concentration pour laquelle nous déposons les sondes habituellement (10 μ M), nous obtenons ainsi une densité de l'ordre de $7-9 \times 10^{12}$ oligonucléotides/cm² pour la sonde HP PstI. Différentes études menées sur des greffages de molécules sur des lames indiquent des résultats du même ordre de grandeur, bien que cela dépende du substrat greffé et de la chimie utilisée (tableau (3.6)).

Nous avons donc pensé que la limitation de la coupure enzymatique pouvait venir d'une densité des sondes trop importante, ce qui pourrait diminuer leur fonctionnalité. Cette hypothèse semble la plus probable puisque nous avons obtenu des pourcentages enzymatiques plus élevés pour les sondes en duplex. Or, lorsqu'on utilise des duplex d'ADN, la première étape consiste à immobiliser un brin d'ADN sur la lame puis dans un second temps à l'hybrider avec le brin complémentaire. Il est admis que l'hybridation des sondes simple brin immobilisées sur une surface n'est pas efficace à 100 %. En effet, Mahajan *et al.* ont, par exemple, estimé à 30 % le maximum d'hybridation pour des sondes immobilisées à 10 μ M par la chimie thiol-Au [Mahajan *et al.*, 2009]. De même, Devaraj *et al.* ont obtenu, pour une densité d'oligonucléotides de l'ordre de 10^{13} molécules/cm², une hybridation de l'ordre de 24 %. Ils ont augmenté ce pourcentage d'hybridation en diminuant la densité des sondes à la surface d'un facteur 10. Pour cela ils ont dilué les

Chimie utilisée	Molécules immobilisées	Densité (molécules/cm ²)	Référence
Chimie click	Ferrocène	$3,46\text{-}7,78 \times 10^{13}$	[Collman <i>et al.</i> , 2004]
Chimie click	ODN simple-brin	$1,1 \times 10^{13}$	[Devaraj <i>et al.</i> , 2005]
Thiol-Au	ODN simple-brin	$4,7\text{-}12 \times 10^{12}$	[Demers <i>et al.</i> , 2000]
Thiol-Epoxy	ODN simple-brin	$5,2 \times 10^{12}$	[Mahajan <i>et al.</i> , 2009]
Thiol-Au	ODN hairpin	$\sim 10^{12}$	[Du <i>et al.</i> , 2005]

Tableau 3.6 – Exemples de densités de greffage de molécules sur lame rapportées dans la littérature.

fonctions réactives à la surface de la lame (1 % de fonctions azoture pour 99 % de fonctions non-réactives alcanes) [Devaraj *et al.*, 2005]. En considérant que le taux d’immobilisation des sondes simple brin présentées dans le chapitre précédent et celui des sondes hairpins est le même, et en considérant que l’hybridation des premières n’est pas de 100 %, nous pouvons raisonnablement estimer que le nombre de sondes hairpins immobilisées est plus important que les duplex formés après hybridation. Ainsi, il est fort probable que la densité des sondes hairpins soit plus importante et limite leur accessibilité aux enzymes. Nous avons donc réalisé plusieurs expériences ayant pour objectif de tester cette hypothèse et ainsi de diminuer cette densité des sondes à la surface des lames.

Diminution de la densité des sondes par dilution

Nous avons, dans un premier temps, diminué la concentration de spotting des sondes. Pour cela nous avons réalisé une première série de dilutions des sondes spottées de 10 μM à 10 nM. Comme nous pouvons le constater sur la figure (3.23), en dessous de 1 μM nous ne distinguons plus les spots par fluorescence. Nous avons donc réalisé une autre gamme de dilution (10 μM , 5 μM , 2 μM). Ainsi nous observons un effet de dilution sur le signal de fluorescence après immobilisation des sondes (figure (3.24a)).

La lame a alors été incubée avec l’enzyme *Pst*I, et nous avons regardé l’effet de la dilution des sondes sur le taux de coupure de la sonde HP *Pst*I. Nous avons ainsi calculé le rapport entre l’intensité de fluorescence de cette sonde après incubation avec l’enzyme et celle de la même sonde incubée uniquement avec du tampon enzymatique (figure (3.24b)). Les dilutions effectuées ne permettent pas d’augmenter ce rapport ce qui nous indique que cette stratégie de dilution n’est pas suffisante pour obtenir l’effet escompté.

Diminution de la densité des sondes par l’utilisation de molécules “spacers”

Nous basant sur des expériences décrites dans la littérature, nous avons testé une autre stratégie qui consiste à utiliser des molécules contenant la fonction alcyne, afin de diluer les sondes nucléiques à greffer sur la surface des lames [Strohsahl *et al.*, 2007, Du *et al.*, 2005]. Nous appelons ces molécules “spacers”. L’hypothèse faite est que ces spacers entrent en compétition avec les sondes, pour la réaction de chimie click avec la surface, ce qui devrait permettre de diminuer la densité des sondes à la surface des lames. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, testé deux molécules chimiques : le dodéc-1-yne (spacer1) et le prop-2-yn-1-ol (spacer2)

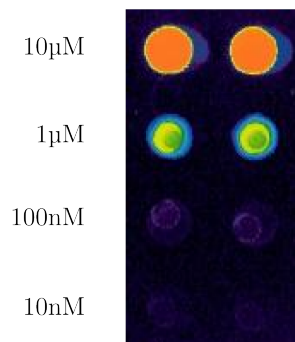
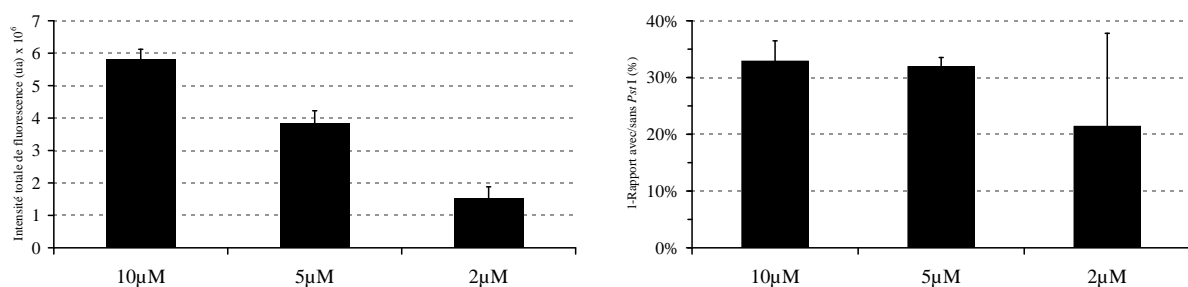


Figure 3.23 – Image en fausses couleurs des spots obtenus après immobilisation de la sonde HP PstI à différentes concentrations



(a) Intensités de fluorescence de la sonde HP PstI après immobilisation. (b) Rapports des intensités de fluorescence après incubation avec et sans *PstI*.

Figure 3.24 – Effet de la dilution de la sonde HP PstI sur l'intensité de fluorescence et sur le taux de coupure par l'enzyme *PstI*.

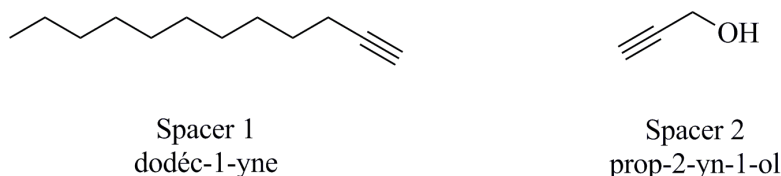


Figure 3.25 – Formule chimique des spacers 1 et 2.

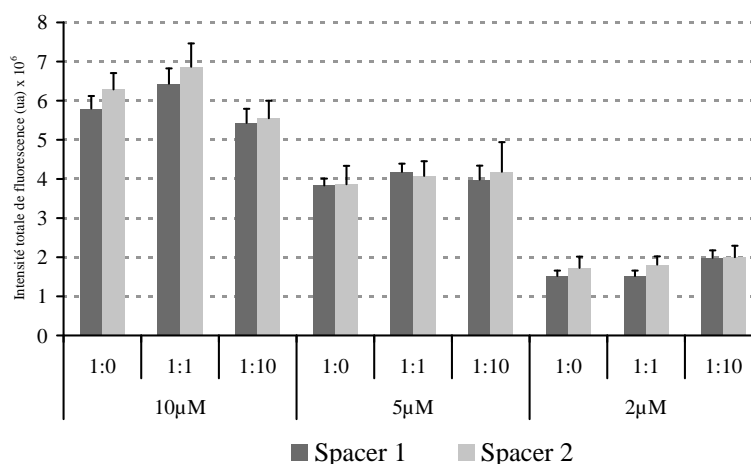


Figure 3.26 – Effet du spacer et de la dilution en sonde sur l’intensité de fluorescence après immobilisation de la sonde HP PstI.

(figure (3.25)) que nous avons ajoutés à la solution à spotter. Nous avons utilisé une dilution de sonde HP PstI (10 μM, 5 μM, et 2 μM) et avons ajouté les spacers suivant un ratio sonde/spacer allant de 1 : 0 à 1 : 10.

Nous avons constaté que l’intensité de fluorescence des sondes immobilisées, pour une concentration donnée de sonde, est peu affectée par l’ajout du spacer (figure (3.26)). Nous avons donc conclu que cette méthode ne permettait pas de diluer les sondes. Après incubation avec l’enzyme *PstI* (10 U) nous n’avons obtenu aucune différence entre les différents ratios réalisés (figure (3.27)). Cette stratégie ne nous permet donc pas d’obtenir l’amélioration attendue sur le taux de coupure enzymatique des sondes.

Ces approches n’apportant pas les résultats escomptés nous avons pensé que la réactivité de ces molécules chimiques “spacers” pouvait être différente de la réactivité des oligonucléotides de par leur structures chimiques très différentes.

Nous avons donc synthétisé un oligonucléotide composé de 10 thymidines et du nucléotide alcyne (spacer T10). De plus, constatant que cette méthode d’utilisation des spacers en gardant constante la quantité de sonde, ne donnait pas un effet de dilution sur les intensités de fluorescence des sondes immobilisées (méthode “sonde constante”), nous avons testé une autre stratégie de dilution des sondes avec des spacers. Celle-ci consiste à garder constante non pas la quantité de sondes mais la quantité totale de molécules possédant la fonction alcyne (méthode “ADN total constant”). Nous avons ainsi testé quatre conditions différentes pour ces deux méthodes de

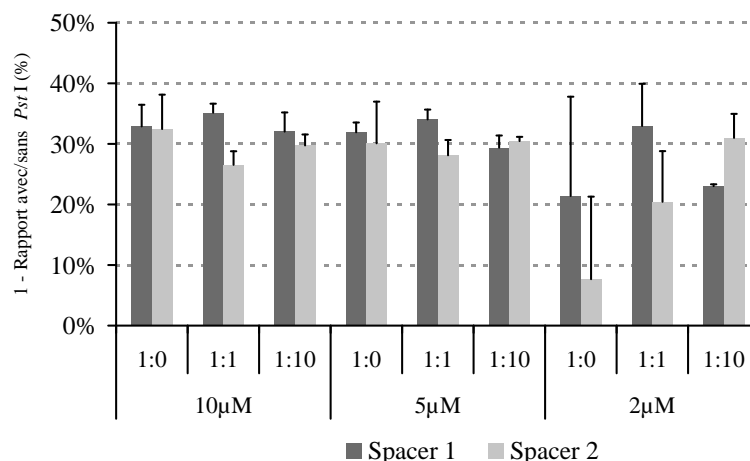


Figure 3.27 – Effet du spacer et de la dilution en sonde sur la coupure de la sonde HP PstI par l'enzyme *PstI*.

	Méthode "sonde constante"	Méthode "ADN total constant"
Condition 0	1 : 0	
Condition 1	1 : 1	1/2 : 1/2
Condition 2	1 : 5	1/4 : 3/4
Condition 3	1 : 10	1/10 : 9/10

Tableau 3.7 – Ratios sonde/spacer utilisés lors des expériences de dilutions par les oligonucléotides spacers.

dilution (tableau (3.7)).

Nous avons alors comparé les intensités de fluorescence des sondes après immobilisation sur les lames. Nous obtenons une diminution de signal de fluorescence uniquement pour la méthode où l'on garde constante la quantité totale de molécules possédant la fonction alcyne (méthode "ADN total constant", figure (3.28)). Pour cette méthode, la diminution du signal n'est néanmoins pas directement proportionnelle au facteur de dilution. Nous obtenons même une augmentation de la fluorescence pour la méthode "sonde constante" lorsque l'on ajoute le spacer T10. Il est connu que les bases de l'ADN peuvent interagir avec les fluorophores. La thymine notamment est connue pour augmenter très fortement la fluorescence du cy3 [Marras *et al.*, 2002], ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus sur les intensités de fluorescence après immobilisation des sondes.

L'une comme l'autre des techniques de dilution des sondes par le spacer T10 ne nous ont néanmoins pas permis d'augmenter significativement les pourcentages de coupure des sondes HP Uracile et HP Uracile 12T après incubation avec un extrait HeLa à 100 µg/mL (figure (3.29)).

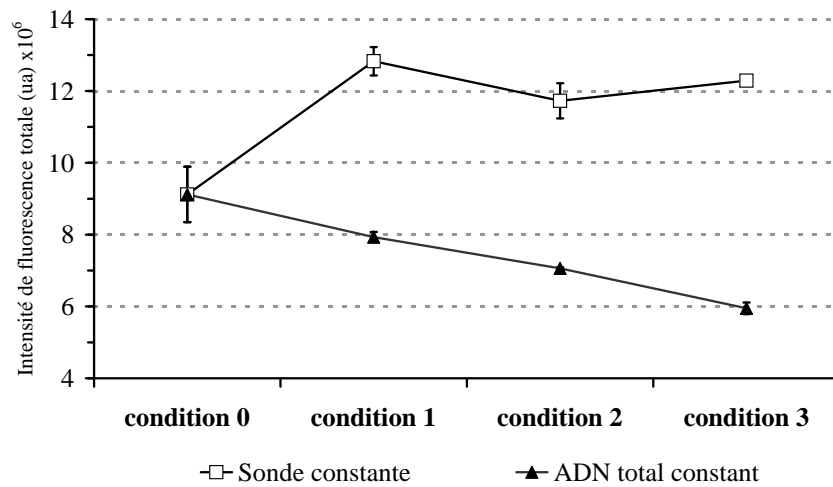


Figure 3.28 – Comparaison des méthodes de dilutions par le spacer T10 sur l'intensité de fluorescence de la sonde HP PstI après immobilisation sur lame.

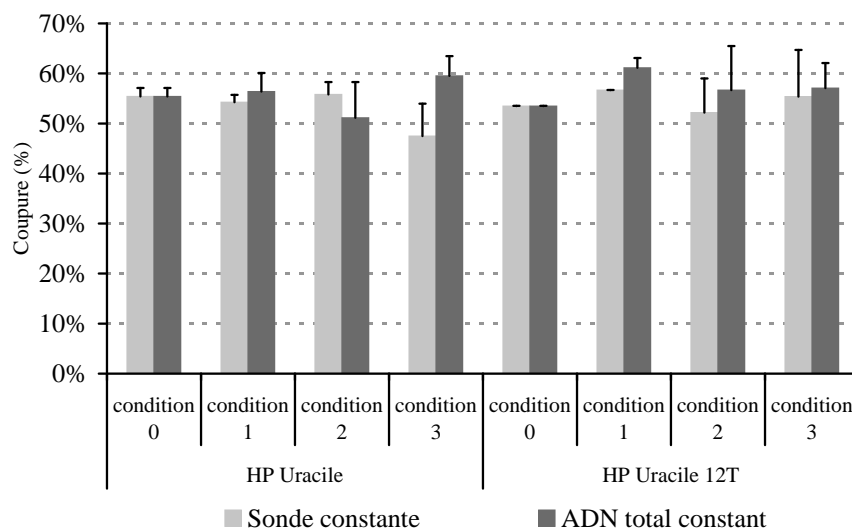


Figure 3.29 – Comparaison des pourcentages de coupure pour les sondes HP Uracile et HP Uracile 12T en fonction de la méthode de dilution avec le spacer T10. Résultats obtenus après incubation avec un extrait HeLa à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

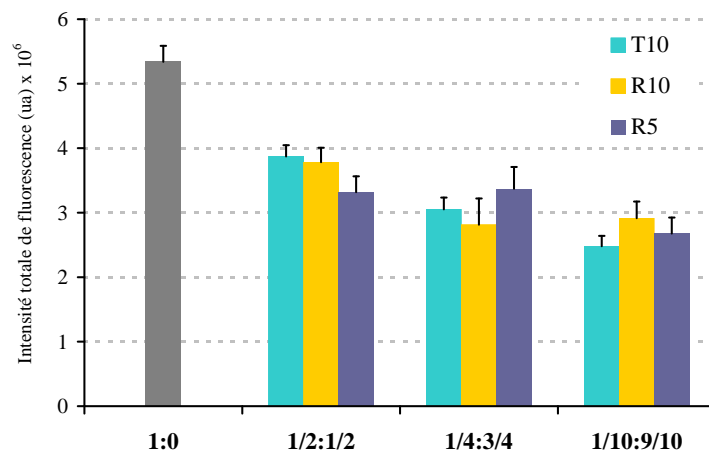


Figure 3.30 – Comparaison de l'intensité de fluorescence de la sonde HP PstI immobilisée sur lame, en fonction de la dilution avec les trois spacers oligonucléotidiques.

Ayant émis l'hypothèse que le spacer T10 pouvait avoir un effet sur la fluorescence des sondes après immobilisation sur lame, nous avons synthétisé deux autres oligonucléotides “spacers” dits “random”, constitués des quatre nucléotides dA, dT, dC et dG de manière aléatoire. Le premier, “spacer R10”, est de même longueur que le spacer T10, l'autre, “spacer R5” est constitué de 5 nucléotides “aléatoires” et du nucléotide alcyne. Les spacers aléatoires doivent nous permettre de moyenner l'effet de la base thymine du spacer T10 sur l'intensité de fluorescence. N'ayant pas observé d'effet sur le taux de coupure de la dilution par le spacer T10, nous avons pensé qu'il était peut-être trop long et gênait l'accessibilité des sondes substrats aux enzymes. C'est pourquoi le spacer R5, plus court, doit également nous permettre de répondre à cette question.

Nous avons alors comparé les intensités de fluorescence des sondes après immobilisation avec ces spacers en utilisant la méthode de dilution “ADN total constant”. L'intensité mesurée pour le ratio “1 : 0” est celle obtenue lorsqu'aucun spacer n'a été rajouté et pour laquelle la sonde est spottée à 10 μ M. Comme l'indique la figure (3.30), nous obtenons des résultats similaires pour les trois spacers oligonucléotidiques utilisés. Ceci nous indique donc que la diminution non linéaire de la fluorescence avec la diminution de sonde spottée en présence du spacer T10 n'est pas due à l'interaction entre la base thymine et le fluorophore. Lors de la manipulation réalisée pour évaluer la densité des sondes à la surface des lames, nous avons observé que seule une très faible quantité de sondes déposées était effectivement greffée, et que le pourcentage d'immobilisation n'est pas exactement le même selon la concentration en sondes déposées. Ceci explique probablement pourquoi le signal de fluorescence ne diminue pas linéairement avec la dilution utilisée.

Nous avons ensuite incubé le biocapteur avec une solution enzymatique. Cette expérience a été réalisée deux fois afin de vérifier quelles pouvaient être les conditions permettant d'obtenir le maximum de coupure. Le tableau (3.8) synthétise les pourcentages de coupure obtenus. Pour les sondes HP Uracile, HP Uracile 12T et HP THF, les pourcentages sont obtenus après incubation avec 100 μ g/mL d'un extrait nucléaire HeLa. Cette manipulation a été réalisée en duplicat, néanmoins certaines difficultés ont été rencontrées au moment du spotting des sondes si bien que certaines valeurs n'ont pu être déterminées (notées, “nd” dans le tableau (3.8)). Pour la sonde HP PstI, les pourcentages de coupure sont calculés après incubation avec 50 U de l'enzyme *PstI*

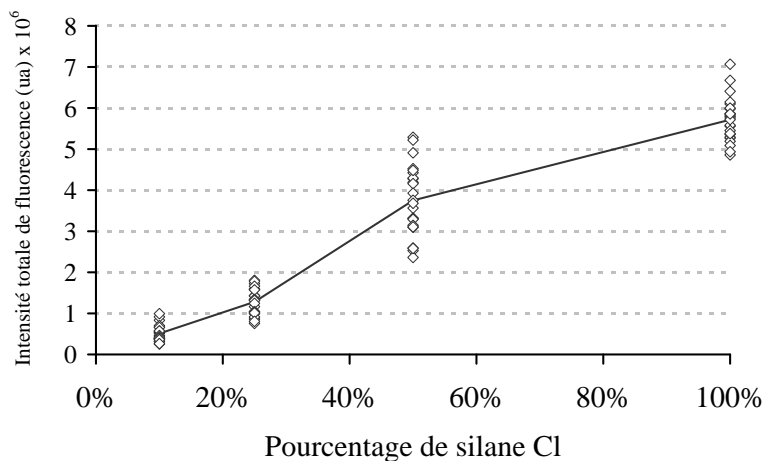
(cette manipulation n’a été réalisée qu’une seule fois). Nous avons indiqué en gras et en italique les maxima de coupure obtenus pour chaque manipulation et chaque sonde. Comme nous pouvons le constater aucune des conditions utilisées ne nous conduit à des coupures proches de 100 %. De plus, les maxima ne sont pas obtenus pour les mêmes conditions de réaction selon la sonde et l’expérience (numéro 1 ou 2). Les gains obtenus par rapport à la condition initiale, sans spacer (1 : 0) sont peu significatifs, si bien qu’il ne semble pas intéressant d’utiliser de tels spacers dans ces conditions.

Ratio sonde : spacer		HP PstI	HP Uracile		HP THF		HP Uracile 12T	
		1	1	2	1	2	1	2
1 : 0		38 %	42 %	59 %	46 %	52 %	39 %	58 %
Spacer T10	1/2 : 1/2	30 %	43 %	57 %	46 %	50 %	38 %	57 %
	1/4 : 3/4	43 %	41 %	60 %	39 %	56 %	39 %	62 %
	1/10 : 9/10	39 %	40 %	59 %	34 %	65 %	40 %	60 %
Spacer R10	1/2 : 1/2	29 %	45 %	56 %	48 %	58 %	46 %	57 %
	1/4 : 3/4	31 %	44 %	59 %	38 %	56 %	45 %	59 %
	1/10 : 9/10	36 %	48 %	62 %	51 %	61 %	47 %	63 %
Spacer R5	1/2 : 1/2	29 %	41 %	55 %	41 %	25 %	53 %	51 %
	1/4 : 3/4	29 %	39 %	59 %	35 %	57 %	46 %	59 %
	1/10 : 9/10	50 %	40 %	56 %	nd	58 %	39 %	nd

Tableau 3.8 – Comparaison des pourcentages de coupures enzymatiques en fonction du spacer utilisé (manipulations 1 et 2). Pour les sondes HP Uracile, HP Uracile 12T, HP THF, les pourcentages sont obtenus après incubation avec 100 µg/mL d’un extrait nucléaire de cellules HeLa. Pour la sonde HP PstI, les pourcentages de coupure sont obtenus après incubation avec 50 U de PstI. (nd = valeurs non déterminées).

Diminution de la densité des sondes par dilution des fonctions azotures

Les tentatives d’amélioration précédentes n’ayant pas permis d’augmenter significativement des taux de coupure enzymatique, une dernière approche a été utilisée en diluant non pas les sondes à spotter mais les fonctions azotures de la lame. Cette stratégie a notamment été utilisée par Devaraj *et al.* [Devaraj *et al.*, 2005]. Pour cela nous avons “bi-silanisé” des lames avec le silane utilisé habituellement (Chlorohexyltriméthoxysilane, noté silane “Cl”) et un silane alcane (Hexyltriméthoxysilane) ne pouvant incorporer la fonction N3 lors de l’étape de substitution. Nous avons ainsi réalisé quatre dilutions du silane “Cl”, exprimées en pourcentage de silane Cl par rapport au silane total (silane Cl + silane alcane) : 100 %, 50 %, 25 % et 10 %. Une fois l’étape de silanisation réalisée, les lames ont été traitées à l’azoture de sodium (NaN₃) afin de substituer les fonctions Cl par un azoture, suivant le protocole habituel. Les sondes ont alors été spottées sur ces lames et leurs intensités de fluorescence après immobilisation ont été mesurées. Nous avons ainsi constaté que les signaux de fluorescence dépendaient linéairement du pourcentage de silane Cl, ce qui indique bien une dilution de la fonction azoture comme nous l’attendions (figure (3.31a)). Néanmoins, nous avons constaté que plus le silane Cl était dilué dans le silane alcane et plus le coefficient de variation (CV) de l’intensité de fluorescence était élevé (figure



(a) Intensité de fluorescence de la sonde HP PstI.

Pourcentage de silane Cl (%)	CV après immobilisation	CV après coupure Enzymatique
100	11 %	2 %
50	23 %	16 %
25	26 %	39 %
10	39 %	44 %

(b) Coefficient de variation de l'intensité de fluorescence de la sonde HP PstI.

Figure 3.31 – Effet de la bi-silanisation sur l'intensité de fluorescence de la sonde HP PstI immobilisée en fonction du pourcentage de silane Cl.

(3.31b)). Les expériences “biologiques” pouvant déjà conduire à d'importantes variations, il est nécessaire d'utiliser des lames reproductibles. Il semble donc difficilement envisageable de réaliser des manipulations enzymatiques pour des conditions donnant des CV supérieurs à 15 % après immobilisation des sondes.

Nous avons néanmoins réalisé une incubation des lames avec un extrait de cellules HeLa, en choisissant les blocs de la lame donnant les meilleurs CV après immobilisation des sondes. Nous n'avons, dans ces conditions, pas pu mettre en évidence un effet bénéfique de la bi-silanisation sur les pourcentages de coupure des sondes. Les coefficients de variation après coupure enzymatique ont même augmenté de manière importante en comparaison avec une silanisation 100 % Cl. En effet, alors que nous obtenons, pour la coupure de la sonde HP Uracile, un CV de 2 % pour la lame “100 % Cl”, nous obtenons un CV de l'ordre de 40 % pour des lames “25 % Cl” et “10 % Cl” (figure (3.31b)). Cette stratégie ne semble donc pas pertinente pour nos applications.

Configuration des sondes sur la surface des lames

Une autre hypothèse est que les sondes ne soient pas trop denses mais soient simplement en partie couchées sur la surface des lames, ce qui limiterait également leur accessibilité. Cette

hypothèse est néanmoins difficile à tester. Il se peut que le linker polythymidine soit trop souple et tester cette hypothèse nécessiterait de concevoir un nouveau design de sonde rigidifiant ce linker. Nous avons précédemment réalisé des mesures de potentiel zéta des lames “azoture”, et avons constaté que les lames “azoture” ont une charge de surface négative (voir paragraphe 2.2.2 page 63 du Chapitre 2). Ceci est plutôt favorable car cela permet de repousser les fragments d’ADN, eux aussi chargés négativement, de la surface mais ne les empêche pas complètement de se coucher partiellement sur la surface [Zammatteo *et al.*, 2000].

3.1.4.3 Conclusions

Il est fort probable que la limitation que l’on observe concernant les taux maximum de coupure enzymatique soit due à une combinaison des hypothèses exposées plus haut. Une partie des sondes nucléiques n’est probablement pas fonctionnelle et génère un signal parasite. Les différentes expériences réalisées à ce jour et présentées ici ne nous ont néanmoins pas conduit à des améliorations significatives. D’autres manipulations peuvent être envisagées afin d’améliorer la sensibilité de nos biopuces. Afin de vérifier si l’hypothèse d’une trop grande densité des sondes hairpins, en comparaison avec le modèle des sondes en duplex, nous pourrions utiliser des sondes de séquences d’intérêt identiques sur les deux modèles (hairpin et duplex) et comparer leur taux de coupure enzymatique maximaux, sur une même lame. Ceci nous permettrait de vérifier si les premières observations se répètent et indiquent une différence significative entre ces deux modèles, ou, si le pourcentage obtenu pour le modèle en duplex était anormalement élevé lors de la manipulation réalisée initialement avec l’enzyme Fpg.

Conscients de la présence persistante de cette limitation, nous avons néanmoins considéré que notre système de biocapteur était suffisamment fonctionnel et performant pour être étendu à d’autres applications biologiques concernant la réparation de l’ADN.

3.1.5 Applications à l’étude d’inhibiteurs de la réparation

Nous avons voulu déterminer la pertinence de la biopuce développée, pour l’étude d’inhibiteurs de la réparation. Nous avons vu que les inhibiteurs de la réparation sont actuellement très étudiés pour l’amélioration des traitements antitumoraux. Dans le cadre de ces études, notre outil semble particulièrement adapté pour le screening de tels inhibiteurs. Nous avons donc étudié deux inhibiteurs connus de la voie de la BER, l’Ugi, inhibiteur de la glycosylase UNG, et la méthoxyamine, inhibiteur de l’AP-endonucléase Ape1.

3.1.5.1 L’Ugi, un inhibiteur de l’UNG

Le peptide “Uracil DNA-Glycosylase Inhibitor”, Ugi, est un inhibiteur connu de la glycosylase UNG [Bennett et Mosbaugh, 1992]. Ce peptide est issu du bactériophage PBS2 et interagit avec la protéine UNG en formant un complexe 1 : 1. Ce complexe stable est formé très rapidement (<30 secondes) et conduit à l’inhibition de l’activité enzymatique de l’UNG [Bennett *et al.*, 1993].

Nous avons donc mis en évidence l’activité inhibitrice de ce peptide, au sein d’un extrait nucléaire HeLa, à l’aide de nos biopuces. Afin de s’assurer de la bonne formation du complexe avec l’UNG présent dans les extraits, nous avons préincubé différentes quantités du peptide Ugi

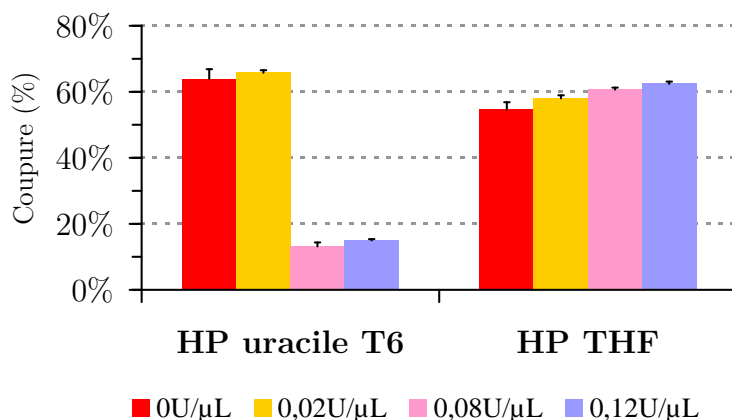


Figure 3.32 – Effet d'inhibition du peptide Ugi sur la coupure par un extrait de cellules HeLa (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), des sondes HP THF et HP Uracile, sur lame.

avec une solution d'extrait nucléaire HeLa à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nous avons ensuite incubé les lames fonctionnelles avec ces différentes solutions.

Nous avons également réalisé une manipulation similaire avec la sonde HP Uracile en solution en présence d'une concentration de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'extrait nucléaire HeLa suivie d'une analyse PAGE.

Sur la biopuce nous obtenons une inhibition spécifique de la coupure de la sonde HP Uracile maximale dès une concentration en Ugi de 0,08 U/ μL (figure (3.32)). En comparaison, l'expérience réalisée en solution, montre une inhibition maximale pour une concentration de 0,1 U/ μL (piste 5, figure (3.33)). Sachant que la concentration en extrait utilisée en solution est 2,5 fois plus élevée que pour la biopuce, on s'attendrait à obtenir un maximum d'inhibition autour de 0,04 U/ μL sur la biopuce. Nous ne disposons pas de ce point exact sur la lame mais, sachant que pour 0,02 U/ μL nous n'obtenons pas d'inhibition de la coupure et que dès 0,08 U/ μL nous avons une inhibition maximum, il est probable que le maximum soit en réalité obtenu pour une concentration intermédiaire. Ceci semble donc cohérent avec l'analyse réalisée en solution.

Comme nous l'attendions, la coupure de la sonde HP THF n'est pas affectée par l'ajout d'Ugi, indiquant bien que cet inhibiteur est spécifique des enzymes de réparation impliquées dans l'excision de la base uracile.

Nous remarquons néanmoins que, bien que l'inhibition de la coupure de la sonde HP Uracile soit maximale, il reste une légère coupure lors de l'expérience sur lame et sur gel. Il est connu que bien que l'UNG soit la glycosylase majoritaire pour la réparation de la base uracile appariée à une adénine, une seconde glycosylase, SMUG1, a également la capacité, plus faible, d'exciser l'uracile dans ce contexte [Kavli *et al.*, 2002, Haushalter *et al.*, 1999]. De plus, il a été montré que l'Ugi inhibe majoritairement UNG et très faiblement SMUG1 [An *et al.*, 2005, Nilsen *et al.*, 2001]. Ainsi, le faible taux de coupure résiduel détecté pourrait être attribué à l'activité de cette glycosylase.

Ces expériences confirment que, dans ces conditions, l'UNG est la principale glycosylase impliquée dans l'initiation de la réparation de l'uracile appariée à une adénine.

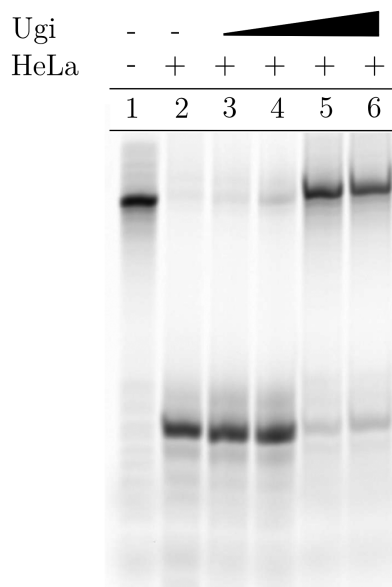


Figure 3.33 – Analyse PAGE de l'inhibition de la réparation de l'uracile par (15 pmoles d'hairpin HP Uracile, 20 μ L ; extraits HeLa nucléaire : 500 μ g/mL ; Ugi : 0.05, 0.075, 0.1, 0.25 U/ μ L).

3.1.5.2 La méthoxyamine, un inhibiteur d'Ape1

Nous l'avons vu précédemment (voir Chapitre 1, paragraphe 1.7.1.2 page 43), l'AP-endonucléase est une cible thérapeutique privilégiée des inhibiteurs de la réparation de l'ADN.

La méthoxyamine est un exemple connu d'inhibiteur de cette enzyme. Son action inhibitrice se fait de manière indirecte par réaction avec le substrat d'Ape1. En effet, cette amine réagit avec la fonction aldéhyde de la forme ouverte du site abasique générant un composé qui n'est plus substrat pour Ape1 [Liu et Gerson, 2004] (figure (3.34)). Cette réaction conduit au blocage de la réparation de l'ADN et mène à la mort cellulaire par un processus évoqué au Chapitre 1 (paragraphe 1.7.1.2 page 43).

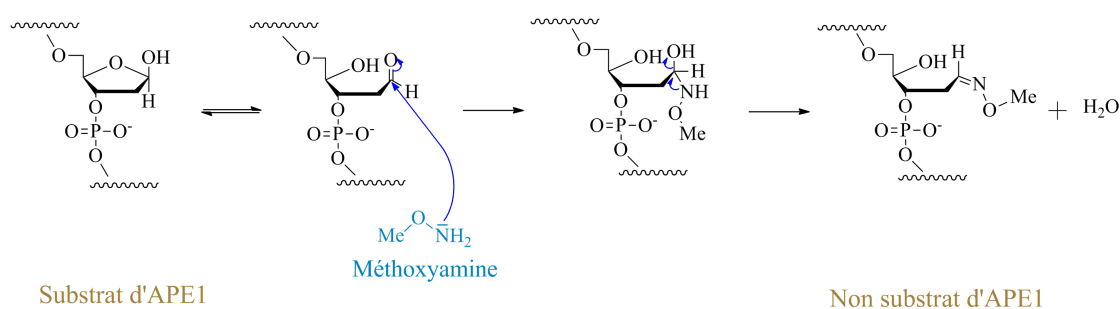


Figure 3.34 – Mécanisme de réaction de la méthoxyamine sur le site abasique.

Nous avons ainsi voulu mettre en évidence cette activité d'inhibition indirecte et spécifique de l'activité de coupure du site abasique par Ape1, à partir de notre biocapteur. Pour cela, nous nous sommes placés à une concentration en extraits nucléaires HeLa de 200 μ g/mL. Il a été décrit précédemment dans la littérature, que la présence de méthoxyamine ne perturbe pas l'activité de la glycosylase UNG [Liuzzi et Talpaert-Borlé, 1985]. Nous avons donc incubé le biocapteur avec une solution contenant à la fois l'extrait cellulaire et la méthoxyamine. Une expérience "témoin"

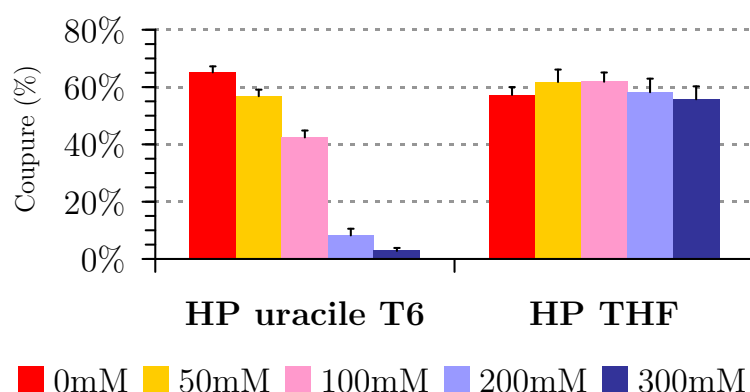


Figure 3.35 – Effet de la méthoxyamine sur la coupure des sondes HP THF et HP Uracile par un extrait nucléaire de cellules HeLa (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sur lame.

a également été réalisée en solution sur les sondes HP Uracile et HP THF suivie d'une analyse PAGE.

Nous avons pu constater une diminution dose-dépendante avec la concentration en méthoxyamine, de la coupure de la sonde HP Uracile, sur lame et sur gel (figures (3.35) et (3.36)). L'ajout de cette molécule n'a pas d'effet sur la coupure de la sonde HP THF, ce qui indique qu'elle n'a pas d'effet direct sur l'enzyme Ape1. Puisqu'il est connu que cette molécule n'interagit pas avec UNG, cela confirme le mécanisme d'action de cette molécule. En effet, le THF est un substrat pour Ape1 mais celui-ci ne possède pas la fonction alcool en position anomérique, permettant l'ouverture du cycle du désoxyribose. Ainsi, pour le THF, la fonction aldéhyde n'est pas présente et ne peut donc pas réagir avec la méthoxyamine.

Sur la biopuce, contrairement aux observations précédentes avec l'Ugi, nous obtenons une inhibition complète, entre 200 mM et 300 mM de méthoxyamine. Nous pouvons noter que cette concentration nécessaire en inhibiteur est très élevée. Il est probable que la méthoxyamine réagisse également avec d'autres composants de l'extrait cellulaire, notamment les protéines. Ainsi, seule une fraction de la méthoxyamine réagit avec le site abasique cible, présent sur la lame. Les protocoles d'études, rapportés dans la littérature, portant sur l'impact de la méthoxyamine sur l'activité d'Ape1, sont souvent décomposés en plusieurs étapes. En effet, dans un premier temps un oligonucléotide contenant une uracile est incubé avec la glycosylase UNG, puis est incubé avec une solution de méthoxyamine (de l'ordre de 50 mM). L'oligonucléotide est alors précipité avant d'être finalement incubé avec Ape1 [Horton *et al.*, 2000, Yan *et al.*, 2007]. Dans ce cas, la méthoxyamine ne peut pas réagir avec d'autres composants ce qui explique les plus faibles concentrations en méthoxyamine utilisées. Dans une autre étude cependant, Rosa *et al.* ont utilisé un oligonucléotide contenant une uracile (270 fmoles) et l'ont incubé avec un extrait cellulaire HeLa en présence de méthoxyamine [Rosa *et al.*, 1991]. Dans ce cas l'inhibition complète de la coupure est observée pour une concentration en méthoxyamine de 200 mM, ce qui est en accord avec les résultats que nous obtenons ici avec nos biocapteurs.

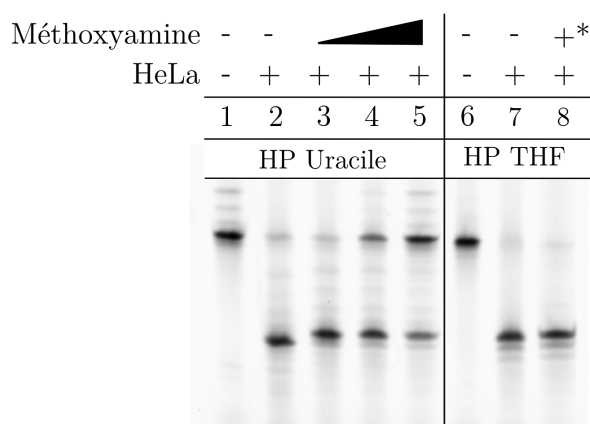


Figure 3.36 – Inhibition, par la méthoxyamine, de la coupure de la sonde HP Uracile (15 pmoles de sonde, 20 μ L ; extrait nucléaire de cellules HeLa : 500 μ g/mL ; Méthoxyamine : 50, 100, 200 mM ; “+*” = 200 mM).

3.1.5.3 Conclusions

Nous avons mis en évidence ici, la performance et la pertinence de la biopuce développée ici pour tester des inhibiteurs de la réparation. Ainsi, la présence de plusieurs sondes portant des substrats différents sur une même biopuce permet de paralléliser les expériences et d’obtenir des informations supplémentaires. Ainsi, ce type de biocapteur nous permet de confirmer les mécanismes d’action, directs ou indirects, des inhibiteurs connus testés. Du fait de la spécificité multiple des enzymes étudiées, notamment de l’Ape1 qui intervient dans la réparation des sites abasiques quelle que soit l’enzyme qui excise la base endommagée, il peut être difficile de conclure sur la cible exacte de molécule inhibitrice (enzymes/substrats). Ainsi, dans le cas précis que nous avons présenté ici, il ne serait pas possible directement de conclure sur le mécanisme de ces inhibiteurs s’ils n’étaient pas déjà connus. Prenons le cas de la méthoxyamine, nous constatons une inhibition de la coupure de l’uracile mais pas du THF, ce qui permet de conclure que son action ne se porte pas sur l’enzyme Ape1. Néanmoins, on pourrait penser que cette molécule agit sur l’enzyme UNG. Ainsi, si nous voulions nous assurer que son action porte sur le substrat “site abasique” et non sur l’enzyme UNG, il suffirait d’incorporer sur la puce une autre sonde reconnue par une autre glycosylase mono-fonctionnelle. Ainsi, si l’effet de cet inhibiteur est visible pour les deux sondes, nous pourrions en conclure que son action est bien liée à la réaction avec le site abasique et non avec la glycosylase UNG. Nous pouvons également procéder par étape en incubant tout d’abord le biocapteur avec la glycosylase UNG purifiée, puis avec l’inhibiteur et enfin avec l’AP-endonucléase purifiée. Il en est de même pour tous les inhibiteurs.

Finalement, le fait que les sondes oligonucléotidiques soient fixées sur un support rend les manipulations beaucoup plus simples notamment si l’on souhaite procéder par étape (suppression des étapes intermédiaires de précipitation de l’ADN lors des test classique d’analyse PAGE). Le fait de pouvoir confiner dans un espace restreint plusieurs sondes substrats pour différentes enzymes de réparation permet de cibler de nombreuses activités enzymatiques et de pouvoir tester l’action de nouvelles molécules candidates pour l’inhibition de la réparation de l’ADN.

3.2 Biopuce à sondes hairpins pour détecter la réparation des bases alkylées

Dans la suite de notre travail présenté ici, nous nous sommes intéressés à la réparation des bases alkylées. Nous entendons ici les petites alkylations des bases telles que la méthylation. Aussi, nous ne parlerons pas des alkylations par des agents pontants tels que le cisplatine.

Comme nous l'avons déjà évoqué, de nombreux agents alkylants, endogènes, présents dans l'environnement ou encore utilisés dans le traitement de certaines pathologies comme le cancer, réagissent avec les bases de l'ADN [Drabløs *et al.*, 2004, Liu et Gerson, 2006]. Selon les agents alkylants utilisés, les sites d'attaque des bases de l'ADN ne sont pas les mêmes (voir Chapitre 1 paragraphe (1.2.1.3), figure 1.8 page 12). Dans tous les cas la position privilégiée est la position N⁷ de la guanine puis, dans une moindre proportion, la position N³ de l'adénine. Dans certains cas on peut également obtenir des alkylations en O⁶ de la guanine. Ces deux types de lésions sont néanmoins réparés par deux mécanismes distincts. En effet, la lésion O⁶-méthylguanine (notée ici O6MeG) est réparée par la voie de la réparation par réversion via l'enzyme MGMT. La lésion N⁷-méthylguanine (notée ici N7MeG) ainsi que la N³-méthyladénine sont, quant à elles, réparées par la voie de réparation par excision de base (BER). La toxicité des agents méthylants a majoritairement été attribuée à la lésion O6MeG, qui, si elle n'est pas réparée par la MGMT, peut conduire à la mort cellulaire par l'intermédiaire de la voie de réparation du MMR.

Dans le cas des traitements chimiothérapeutiques méthylants, les études ont principalement été menées sur la MGMT et celles portées sur la résistance des tumeurs aux traitements méthylants ont principalement porté sur cette enzyme et la voie de réparation du MMR [D'Atri *et al.*, 1998, Liu *et al.*, 2006]. Les adduits réparés par la BER (N7MeG et N3MeA) étant néanmoins majoritaires, il semble intéressant d'étudier le rôle de cette voie de réparation de l'ADN dans ce mécanisme de résistance. De nombreuses études ont étudié le lien entre cette glycosylase et la réponse des cellules à des stress alkylant (voir Chapitre 1, paragraphe 1.7.1.1 page 41). Par exemple, des études ont montré que certains agents alkylants (MNU, induisant les deux types de lésions et MMS n'induisant pas de lésions O6MeG), provoquent une dégénérescence de la rétine. Sur ce modèle cellulaire, Meira *et al.* ont montré qu'un traitement au MMS et au MNU induisait une dégénérescence de la rétine chez les souris "wild type" et MGMT^{-/-} alors que des souris Aag^{-/-} étaient résistantes à cette dégénérescence, ce qui indique le rôle de l'Aag dans la mort cellulaire de ces cellules [Meira *et al.*, 2009]. Roth *et al.* ont également observé une résistance au MMS pour des cellules myéloïdes progénitrices de moelle osseuse issues de souris déficientes en cette glycosylase [Roth et Samson, 2002]. D'autres études ont également démontré que la sensibilité au témozolomide, agent méthylant utilisé en chimiothérapie, était corrélée avec une surexpression de la glycosylase Aag qui, en l'absence de la polymérase β , conduisait à l'accumulation d'intermédiaires toxiques [Trivedi *et al.*, 2008, Trivedi *et al.*, 2005].

Il semble donc intéressant de pouvoir étudier sur un même outil ces deux mécanismes de réparation des bases alkylées que sont la BER et la réparation par réversion (MGMT).

Pour ce faire, nous avons introduit deux nouvelles sondes nucléiques dans notre biocapteur contenant deux lésions substrats, l'hypoxanthine et la O⁶-méthylguanine, chacune reconnue par l'une ou l'autre de ces deux voies de réparation (tableau (3.9)).

La base hypoxanthine, issue de la désamination de l'adénine, est un substrat connu pour

	Sonde	Séquence (5'→3')
Suivant la séquence	HP PstI	X-TTT TTT TGA ACT GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	HP THF	X-TTT TTT TGA AC(THF) GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	PstI	HP Uracile X-TTT TTT TGA ACT U CA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	HP O6MeG	X-TTT TTT TGA ACT O6MeG CA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
Suivant la séquence	HP EcoRI	X-TTT TTT TGA AGA ATT CCT CCT TTTT AGG AGG AAT TCT TCA <i>cy3</i> T
	EcoRI	HP Inosine X-TTT TTT TGA AGA ITT CCT CCT TTTT AGG AGG AAT TCT TCA <i>cy3</i> T

Tableau 3.9 – Séquences des sondes nucléiques auto-complémentaires synthétisées et immobilisées sur lame, pour la réalisation de la biopuce dédiée à la détection de la réparation des bases alkylées.

la glycosylase Aag responsable de la réparation des bases alkylées (N⁷-alkylguanine et N³-alkyladénine) par la voie de la BER. Nous avons choisi d'utiliser cette lésion plutôt que les bases N7MeG et N3MeA car celles-ci sont peu stables et conduisent à une dépurination spontanée. Le nucléotide inosine, correspondant à la base hypoxanthine, a été introduit dans la séquence de la sonde “HP Inosine”.

Pour étudier la réparation par réversion qui met en jeu la MGMT, nous avons utilisé une sonde nucléique contenant la lésion O6MeG. Le principe du test utilisé pour détecter cette activité de réparation sera détaillé plus loin dans le manuscrit (voir paragraphe 3.2.2 page 126).

Nous avons également introduit une nouvelle sonde non-lésée possédant le site de restriction de l'enzyme *EcoRI* dont la fonction “témoin” sera également expliquée plus loin (voir paragraphe 3.2.2 page 126).

3.2.1 Activité de l'Alkyladénine ADN-glycosylase, Aag

Nous avons, dans un premier temps, étudié la réparation par l'Aag car celle-ci met en oeuvre un mécanisme similaire à l'UNG (glycosylase mono-fonctionnelle), déjà étudiée sur le biocapteur.

3.2.1.1 Activité de l'enzyme purifiée et au sein d'un extrait nucléaire HeLa

Activité de l'enzyme Aag purifiée

Nous avons tout d'abord contrôlé l'activité d'excision de l'enzyme Aag purifiée, vis-à-vis de la nouvelle sonde, HP Inosine, introduite sur le biocapteur. Cette glycosylase étant mono-fonctionnelle, nous avons procédé de manière similaire à l'étude de la glycosylase UNG, en co-incubant la sonde substrat avec la glycosylase à étudier et l'AP-endonucléase humaine (Ape1) dans le tampon enzymatique de cette dernière.

La pureté et la fonctionnalité de la sonde HP Inosine ont tout d'abord été vérifiées, dans ces conditions en solution par une analyse PAGE. La figure (3.37a) montre le résultat de l'analyse PAGE. Ainsi, nous constatons la présence d'une seule bande pour l'oligonucléotide seul, ce qui

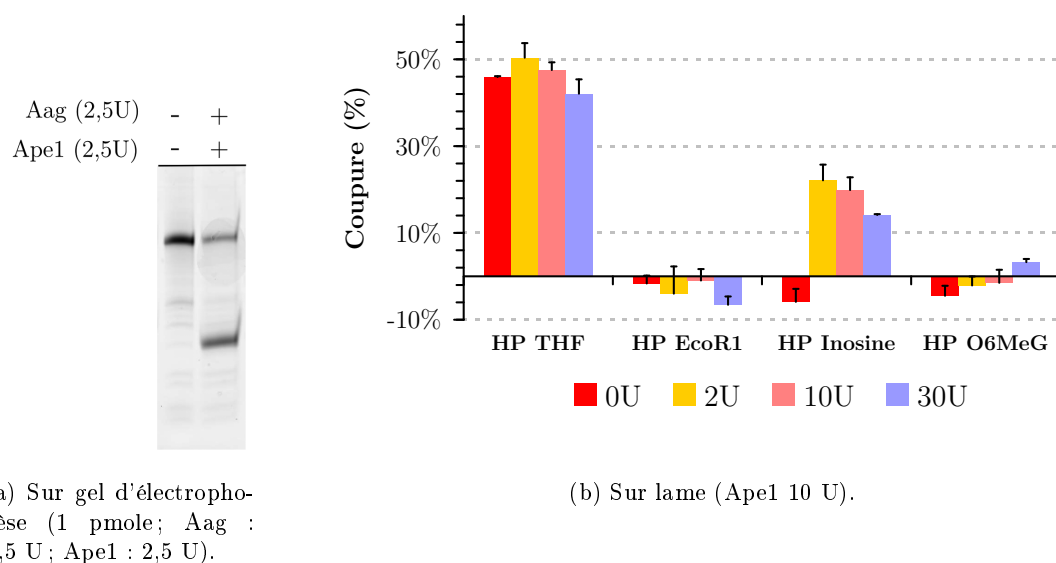


Figure 3.37 – Coupure de la sonde HP Inosine par la glycosylase Aag purifiée, en présence d'Ape1.

nous permet d'affirmer la pureté de la sonde. De plus, lorsque la sonde a été préalablement incubée avec les enzymes Aag et Ape1, on note la présence d'une bande inférieure, qui correspond à la coupure spécifique de la sonde. Ceci nous montre donc que la glycosylase Aag, est bien fonctionnelle dans ces conditions. Néanmoins, on constate que, dans ce cas, la coupure n'est pas complète et qu'une partie de la sonde reste intacte.

Concernant les expériences sur lame, nous avons réalisé une gamme de concentration en Aag avec une quantité fixe de Ape1 (10 U). La série "0 U" correspond au pourcentage de coupure obtenu en absence d'Aag mais en présence d'Ape1. Comme l'indique la figure (3.37b), seules les sondes HP THF et HP Inosine sont coupées dans ces conditions, ce qui est conforme à ce que l'on attendait puisque seules ces deux sondes sont substrats pour les deux enzymes utilisées pour cette expérience (Aag et Ape1). Nous constatons que la coupure de la sonde HP Inosine, est obtenue uniquement en présence de la glycosylase Aag. Nous remarquons que le taux de coupure de la sonde HP Inosine est significativement plus faible que celui de la sonde HP THF. De plus, ce taux de coupure est inférieur à celui que nous avons obtenu pour l'expérience sur la glycosylase UNG, elle aussi mono-fonctionnelle (paragraphe 3.1.3.1 page 93). Nous notons également que pour des quantités d'Aag supérieures à 10 U, le taux de coupure de la sonde HP Inosine, a tendance à décroître.

Plusieurs résultats d'études rapportés dans la littérature, montrent des taux de coupure maximum par Aag inférieurs à 100 % [Adhikari *et al.*, 2007, Kreklau *et al.*, 2001]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce fait. Tout d'abord, nous avons choisi un temps d'incubation d'une heure d'après les résultats obtenus pour la glycosylase mono-fonctionnelle UNG. Néanmoins, dans ce cas, il aurait peut-être été intéressant de regarder si une incubation plus longue permettait d'augmenter ce pourcentage de coupure. Il semble également que cette glycosylase soit particulièrement sensible au tampon enzymatique utilisé [Kreklau *et al.*, 2001]. Aag

est notamment sensible à la présence d'autres protéines. Ainsi, Maher *et al.* ont montré que la présence des protéines UNG, Ape1, EndoIV ou encore du β -clamp stimulait l'activité de cette enzyme [Maher *et al.*, 2007]. De plus, Aag a une forte affinité pour le site abasique, il aurait peut-être été nécessaire d'ajouter plus d'Ape1 pour la déplacer [Maher *et al.*, 2007]. Cette enzyme semble également être sensible au pH et à la force ionique [Baldwin et O'Brien, 2009, O'Brien et Ellenberger, 2003]. Enfin, il semblerait que, dans certains cas, la présence de cations di-valents (Mg^{2+} , Zn^{2+}), nécessaire à l'activité d'Ape1, inhiberait la fixation de Aag sur la lésion hypoxanthine, bien que le tampon commercial en notre possession en contienne [Adhikari *et al.*, 2006]. Nous ne nous sommes pas attardés sur ce point puisque notre objectif est de mesurer simultanément l'activité d'Aag et d'Ape1.

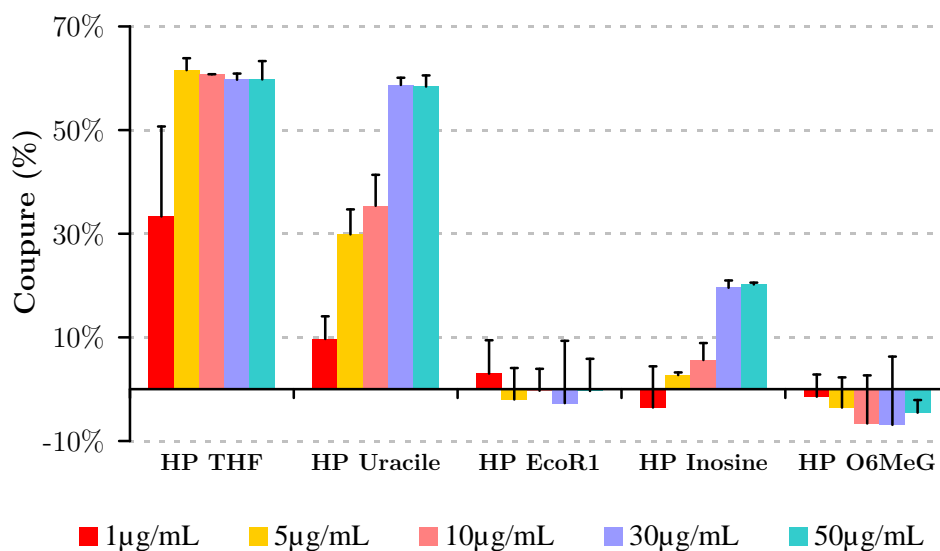
Cette glycosylase semble ainsi très sensible, contrairement à l'UNG précédemment étudiée, aux conditions de réaction et les résultats rapportés dans la littérature permettent simplement d'évoquer quelques possibilités d'explication des résultats. Il est également possible, que cette glycosylase requiert d'autres cofacteurs encore non-identifiés, et non-présents lors de nos expériences.

Activité au sein d'un extrait nucléaire de cellules HeLa

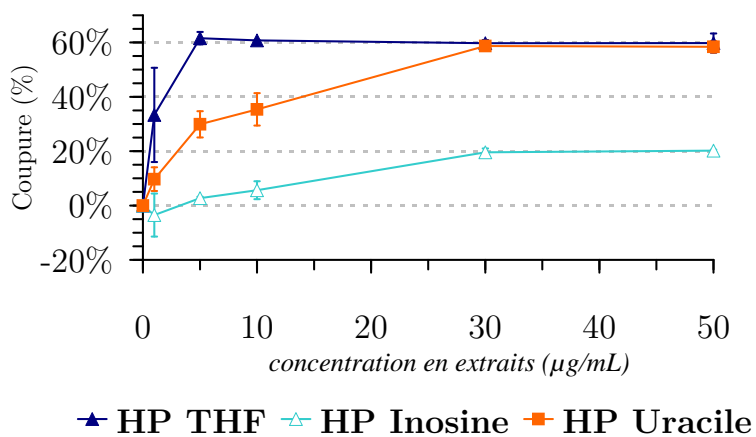
Nous avons ensuite cherché à détecter l'activité de la glycosylase Aag au sein d'extraits cellulaires. Pour cela, nous avons incubé la lame fonctionnalisée par les sondes nucléiques, avec une gamme de concentration en extrait nucléaire de cellules HeLa.

Comme l'indique la figure (3.38), il apparaît clairement une coupure spécifique des trois sondes HP THF, HP Uracile et HP Inosine. Nous pouvons noter que le plateau est atteint pour une concentration d'extrait de 30 $\mu\text{g/mL}$. Nous constatons également que l'activité de l'Aag (substrat Inosine) est beaucoup plus faible que celles mesurées pour l'UNG et l'Ape1 (sondes HP Uracile et HP THF respectivement). En effet, le pourcentage de coupure de l'inosine n'est au maximum que de 50 % de ce que l'on obtient pour l'uracile et le THF. Des résultats similaires de faibles activités de Aag en comparaison de celles d'UNG et d'Ape1 sont rapportés dans la littérature [Kreklau *et al.*, 2001, Sauvaigo *et al.*, 2004]. Ceci pourrait s'expliquer du fait que les conditions opératoires ne sont pas optimales pour l'activité de Aag (cations di-valents, pH, force ionique). Si, plus tard nous voudrions mesurer uniquement cette activité enzymatique, il pourrait être intéressant d'optimiser ces conditions de réaction. Néanmoins, dans la cas présent, l'objectif est de détecter, avec une sensibilité "correcte", plusieurs activités enzymatiques simultanément.

Nous avons confirmé ces résultats à l'aide d'une expérience en solution suivie d'une analyse PAGE. Pour cela nous avons incubé les sondes HP Inosine, HP THF et HP Uracile en solution avec une gamme de concentration en extrait nucléaire HeLa dans des conditions similaires à la manipulation réalisée précédemment sur les hairpins THF et Uracile. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure (3.39). Nous remarquons que la coupure de l'uracile est maximale pour une concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$ (piste 12, figure (3.39a)), plus faible que lors de la précédente manipulation (figure 3.17 page 95). Cela peut s'expliquer par le fait que, pour cette manipulation, nous avons utilisé un lot d'extrait différent, qui n'a probablement pas exactement les mêmes spécificités que le précédent. Ceci est d'autant plus vrai que les concentrations, données par le fournisseur, sont exprimées en quantité totale de protéines, si bien qu'il se peut que, d'une extraction à l'autre, les compositions exactes pour une même concentration ne soient pas



(a) Histogramme de coupure des différentes sondes hairpins.



(b) Activités des enzymes Ape1, UNG et Aag, présentes au sein de l'extrait cellulaire, vis-à-vis des différentes sondes hairpins substrats

Figure 3.38 – Pourcentage de coupure, par une gamme d'extrait nucléaire HeLa, des différentes sondes nucléiques immobilisées sur lame.

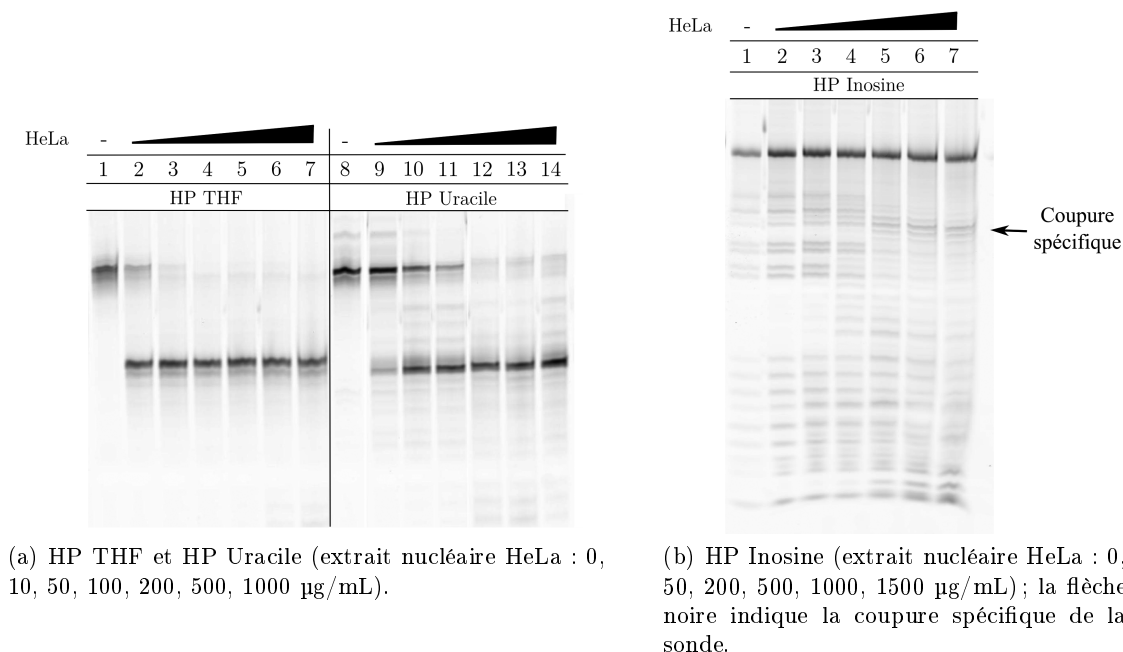


Figure 3.39 – Analyse par gel d'électrophorèse de la coupure des hairpins HP Inosine, HP THF et HP Uracile après incubation (1 h, 37 °C) avec une gamme extrait nucléaire HeLa (15 pmoles d'hairpin, 20 µL).

exactement identiques.

Concernant la coupure de la sonde HP Inosine, nous obtenons, dans ces conditions de réaction, une très légère coupure spécifique (figure (3.39b)). Il semble que pour cette manipulation en solution il soit nécessaire d'utiliser des concentrations en extrait plus élevées que pour les substrats THF et uracile.

Afin de mieux détecter, en solution, cette coupure résultant de l'activité de la glycosylase Aag, nous avons diminué la quantité de sonde substrat HP Inosine (1 pmole) et diminué le volume de réaction (10 µL). Dans ces nouvelles conditions nous observons l'apparition d'une bande de coupure spécifique nette, dont l'intensité dépend de la concentration en extrait (figure (3.40)). Après quantification de la bande de coupure par rapport à la bande du produit de départ, nous obtenons un plateau à partir de 500 µg/mL de protéines, correspondant à un pourcentage de coupure d'environ 20 %. Il est à noter qu'à ces concentrations en extrait, on obtient une légère dégradation non-spécifique de la sonde qui vient bruite la mesure. Les conditions auraient peut-être pu être optimisées pour limiter cette dégradation, en modifiant notamment la composition du tampon enzymatique. Nous aurions pour cela, pu ajouter plus d'EGTA afin de limiter l'action des nucléases. En effet, les nucléases cellulaires sont actives en présence de Mg^{2+} et ainsi l'ajout d'un chelateur de ce cation permet de diminuer leur activité. Néanmoins, l'enzyme Ape1 a également besoin de ce cofacteur pour être active. Ainsi, il est possible, pour détecter uniquement l'activité de l'Aag au sein d'extraits cellulaires, d'ajouter une forte concentration en EGTA ou EDTA afin de complexer les cations di-valents, puis réaliser l'étape de coupure du site abasique par un procédé chimique (hydrolyse en milieu basique). Néanmoins, ne perdons pas de vue que notre objectif est de détecter les activités de ces enzymes simultanément, à l'aide du biocapteur que nous avons développé.

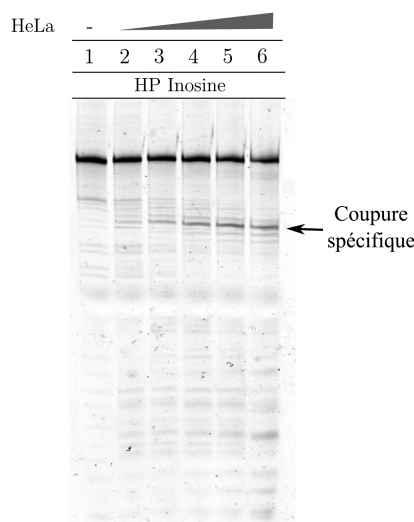


Figure 3.40 – Analyse PAGE de la coupure de l'hairpin HP Inosine après incubation (1h, 37°C) avec une gamme d'extrait nucléaire HeLa (1 pmole de sonde hairpin, 1 h 37 °C, 10µL ; extraits : 0, 50, 250, 500, 1000 µg/mL). La flèche noire indique la coupure spécifique. de la sonde.

Comme nous l'ont montré ces différentes expériences, l'activité de la glycosylase Aag est délicate à détecter. En comparant les manipulations sur lame et en solution, nous constatons que les gammes de concentration en extrait utilisées sont très différentes. En solution, il est nécessaire d'utiliser une concentration en extrait beaucoup plus élevée pour détecter la coupure de la sonde HP Inosine, par rapport aux sondes HP THF et HP Uracile. Au contraire, sur notre biocapteur, les gammes de concentration nous permettant de mesurer ces trois activités de réparation sont du même ordre de grandeur. Il est probable que cela provienne des conditions expérimentales qui diffèrent entre la réaction en solution et sur support. Ainsi, la présence du support a probablement un impact sur l'activité de l'enzyme Aag, qui, nous l'avons vu est très sensible aux conditions de réaction.

3.2.1.2 Étude des activités de réparation de lignées cancéreuses de glioblastomes humains U373

Nous avons vu que de nombreuses études avaient été menées sur la résistance de certaines tumeurs aux traitements anticancéreux alkylants. Aucun traitement curatif n'est à ce jour disponible pour les gliomes malins. Un des traitements utilisés est l'agent méthylant témozolomide (TMZ) seul ou en combinaison avec une radiothérapie [Stupp *et al.*, 2009, Spiegl-Kreinecker *et al.*, 2010, Liu et Gerson, 2006]. Il est néanmoins connu que le traitement avec des agents alkylants, tels que le TMZ, conduit à une résistance des cellules cancéreuses limitant ainsi leur efficacité [Liu et Gerson, 2006, Alvino *et al.*, 2006].

Dans le cadre d'une collaboration avec de Dr L. Pelletier, de l'Institut des Neurosciences de Grenoble (unité Inserm U835, équipe 7), nous nous sommes intéressés aux capacités de réparation d'un modèle cellulaire de glioblastomes résistants au témozolomide développé à partir de la lignée U373. Ainsi la lignée U373-IV3 est issue de la lignée U373 après implantation sous-cutanée de cellules U373 chez la souris. Une seconde lignée, U373-IV3-TMZ, a été établie après implantation sous-cutanée de cellules U373 chez la souris et traitement au témozolomide, ce qui les a rendues

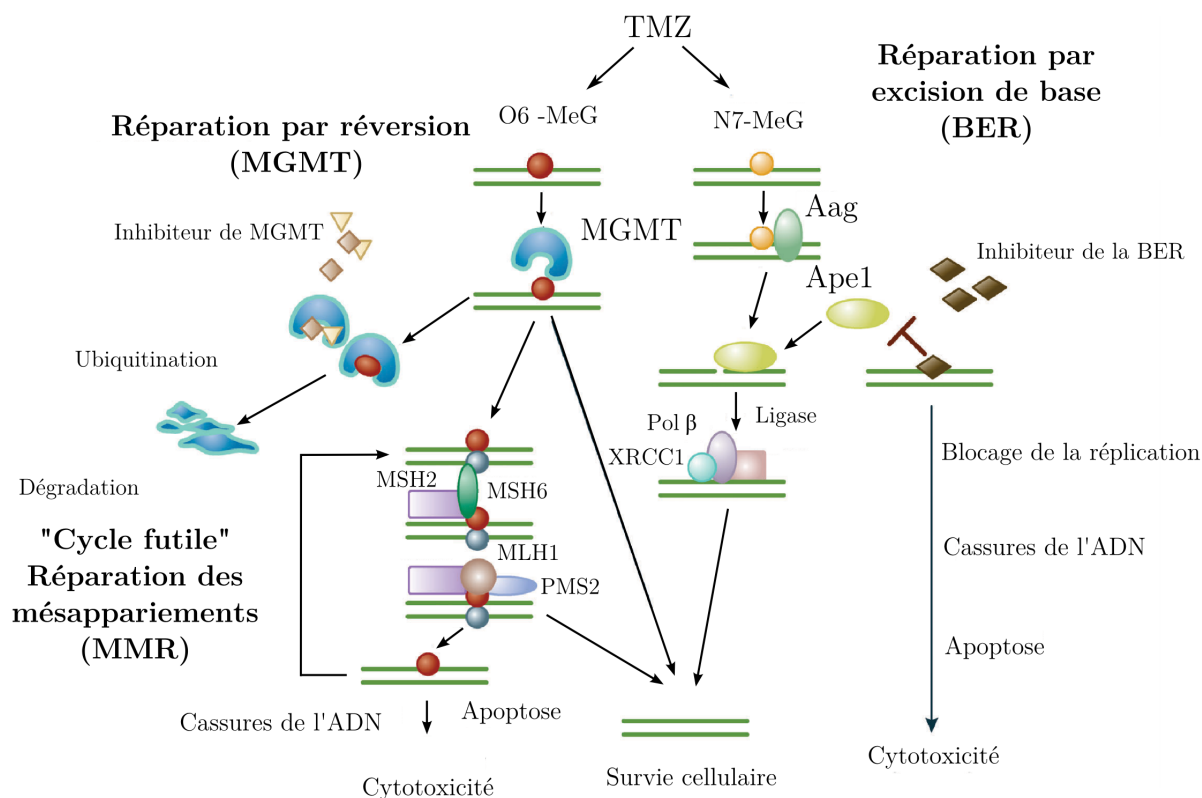


Figure 3.41 – Lésions de l'ADN générées par le témozolomide et voies de la réparation impliquées, adapté de [Liu et Gerson, 2006].

résistantes à cet agent.

Le témozolomide méthyle les positions N⁷ (~70 % des adduits formés), O⁶ (~6 % des adduits formés) et de la guanine et la position N³ de l'adénine (~9 %) [Liu et Gerson, 2006]. Ces lésions sont néanmoins réparées par deux mécanismes distincts comme nous l'avons déjà rapporté (figure (3.41)). Ainsi, la lésion O⁶-méthylguanine (O6MeG) est réparée par la voie de la réparation par réversion via l'enzyme MGMT. Les lésions N⁷-méthylguanine et N³-méthyladénine, sont, quant à elles, réparées par la voie de réparation par excision de base (BER). L'efficacité antitumorale du TMZ est principalement attribuée à la formation de la lésion O6MeG, qui génère une toxicité faisant intervenir la voie de réparation du MMR. Les études analysant la résistance des tumeurs à ce traitement alkylant ont principalement porté sur l'enzyme MGMT et les protéines du MMR. Il a notamment été montré que la méthylation du promoteur de la MGMT était liée à une meilleure efficacité du traitement des tumeurs [Stupp *et al.*, 2009, Liu et Gerson, 2006, Stupp *et al.*, 2007] (voir paragraphe 1.7.2.1 page 45). Les adduits réparés par la BER étant néanmoins majoritaires, il semble intéressant d'étudier le rôle de cette voie de réparation dans ce mécanisme de résistance, d'autant que certaines études sur d'autres modèles cellulaires, ont montré qu'une déficience en Aag conduisait à une résistance aux agents alkylants MMS et MNU [Meira *et al.*, 2009, Roth et Samson, 2002].

Il nous a donc semblé intéressant d'étudier la réparation par la voie de Aag/Ape1 pour les trois lignées cellulaires développées notamment celle résistante au témozolomide (U373-IV3-TMZ).

Pour cela, nous avons tout d'abord préparé des extraits nucléaires pour ces trois lignées et avons dosé la concentration totale en protéines pour chaque extrait. Nous avons ensuite incubé

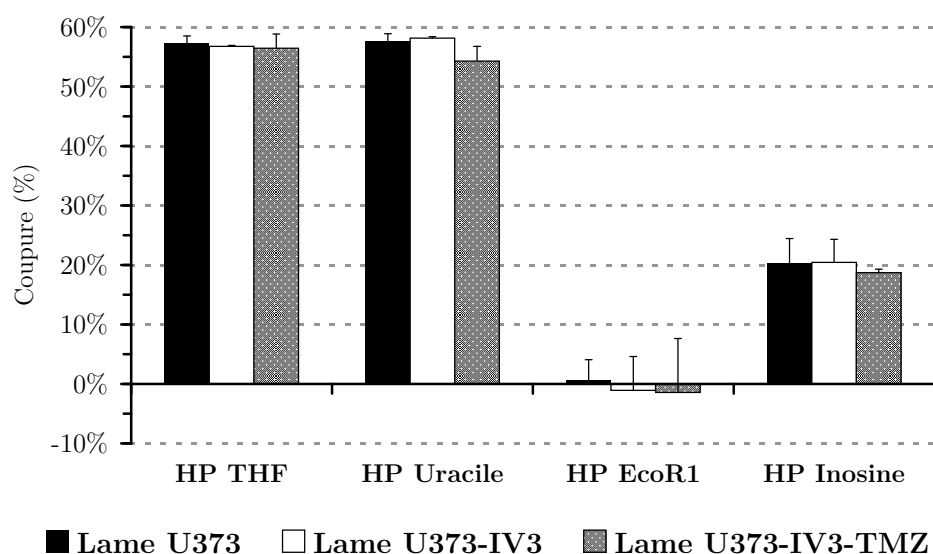


Figure 3.42 – Comparaison de la coupure par un extrait nucléaire HeLa 50µg/mL sur les trois lames “U373”, “U373-IV3” et “U373-IV3-TMZ”.

le biocapteur, sur lequel avaient été préalablement immobilisées les sondes évoquées plus haut, avec une gamme de chaque extrait de manière similaire à l’expérience réalisée pour l’extrait HeLa nucléaire. Ainsi, chaque lame correspond à une lignée cellulaire étudiée. Nous avons également incubé, pour chaque lame, deux blocs avec une solution d’extrait nucléaire HeLa (50 µg/mL). Ceci nous permettra de disposer de blocs de référence afin de vérifier la reproductibilité des lames et de s’assurer qu’il nous est permis de les comparer entre elles.

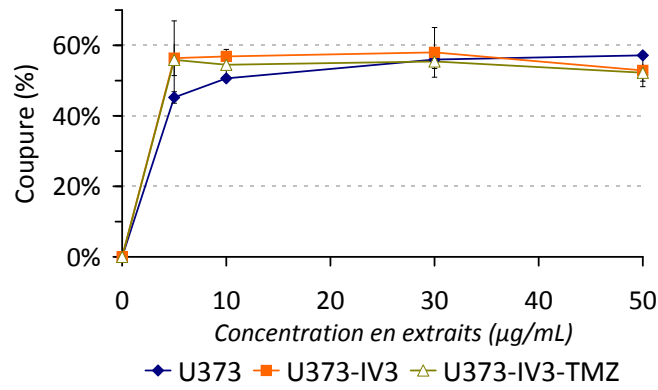
Comme l’indique la figure (3.42), les taux de coupure des différentes sondes par l’extrait nucléaire HeLa sont similaires pour les trois lames. Nous pouvons donc les comparer entre elles dans la suite de notre présente étude.

Nous avons ainsi représenté sur un même graphique les pourcentages de coupure obtenus pour les trois lignées en fonction de la concentration protéique avec laquelle le biocapteur a été incubé (figure (3.43)). La coupure de la sonde HP THF représente l’activité de l’enzyme Ape1, celle de la sonde HP Uracile, l’activité du couple UNG/Ape1 et celle la sonde HP Inosine, l’activité du couple Aag/Ape1.

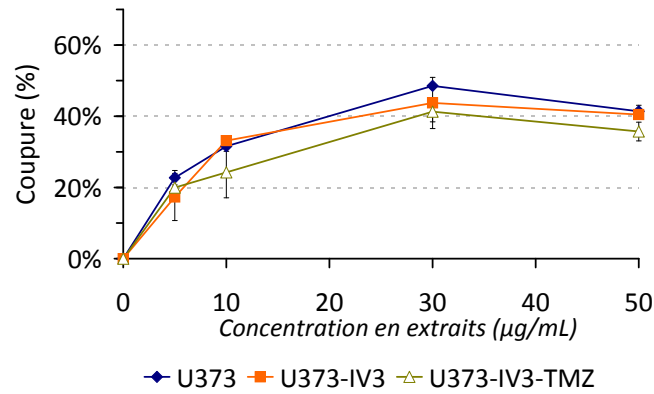
Nous observons ainsi, une coupure similaire par Ape1 tout comme UNG/Ape1 pour les trois lignées (figures (3.43a) et (3.43b)). Ces résultats ont été confirmés par une analyse complémentaire sur gel d’électrophorèse pour ces trois lignées, pour lesquelles nous observons une dose-dépendance similaire (figure (3.44)).

Concernant l’activité de Aag/Ape1, nous constatons une différence d’activité pour ces trois lignées. En effet, il apparaît que la lignée U373-IV3-TMZ présente une activité beaucoup plus faible. N’ayant pas observé de différence d’activité pour Ape1, nous pouvons attribuer cette baisse d’activité à la glycosylase Aag.

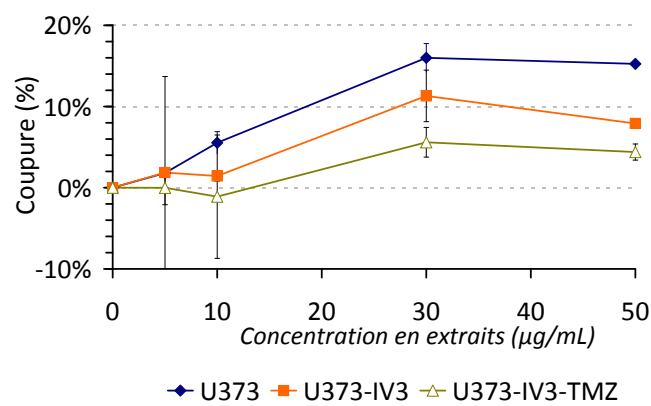
Nous n’avons pas pu confirmer ce résultat par analyse PAGE, la coupure spécifique à l’action d’Aag étant trop faible et la dégradation de la sonde en solution trop importante. Nous avons



(a) Comparaison de l'activité d'Ape1.



(b) Comparaison de l'activité d'UNG.



(c) Comparaison de l'activité d'Aag.

Figure 3.43 – Comparaison des activités de Ape1 (sonde HP THF), UNG (sonde HP Uracile) et Aag (sonde HP Inosine) au sein des extraits nucléaires de cellules U373, U373-IV3, U373-IV3-TMZ.

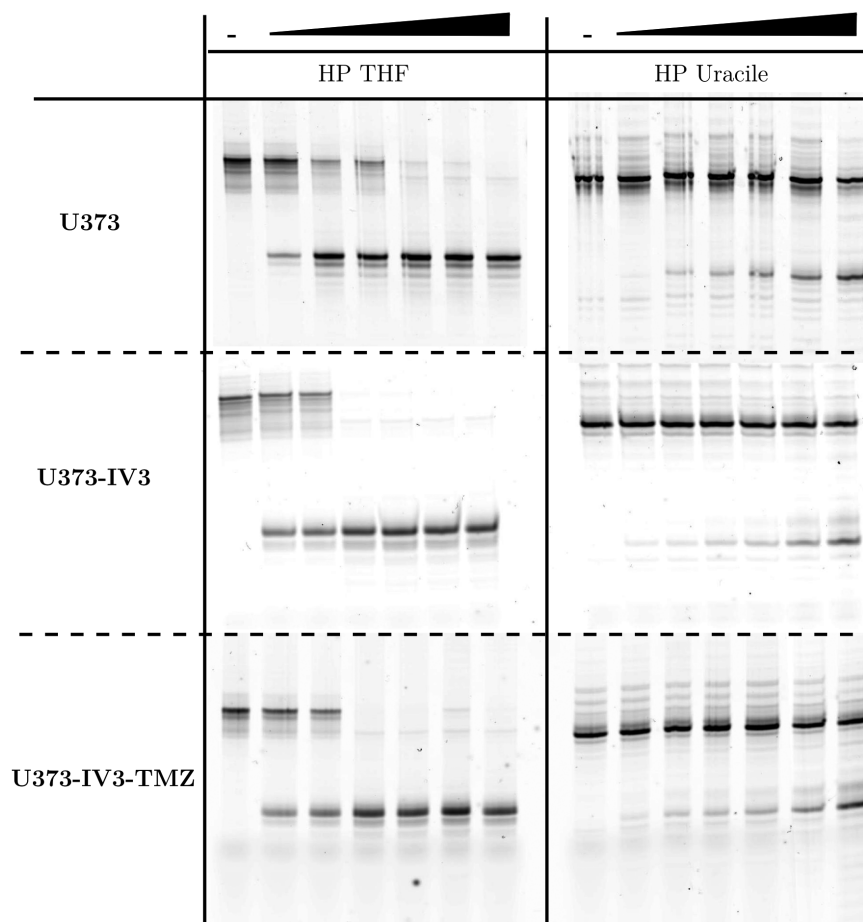


Figure 3.44 – Comparaison des activités Apel et UNG/Apel pour les trois lignées U373, U373-IV3 et U373-IV3-TMZ après analyse sur gel d'électrophorèse (1 pmoles, 1 h 37 °C, 10 µL ; extraits : 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50 µg/mL).

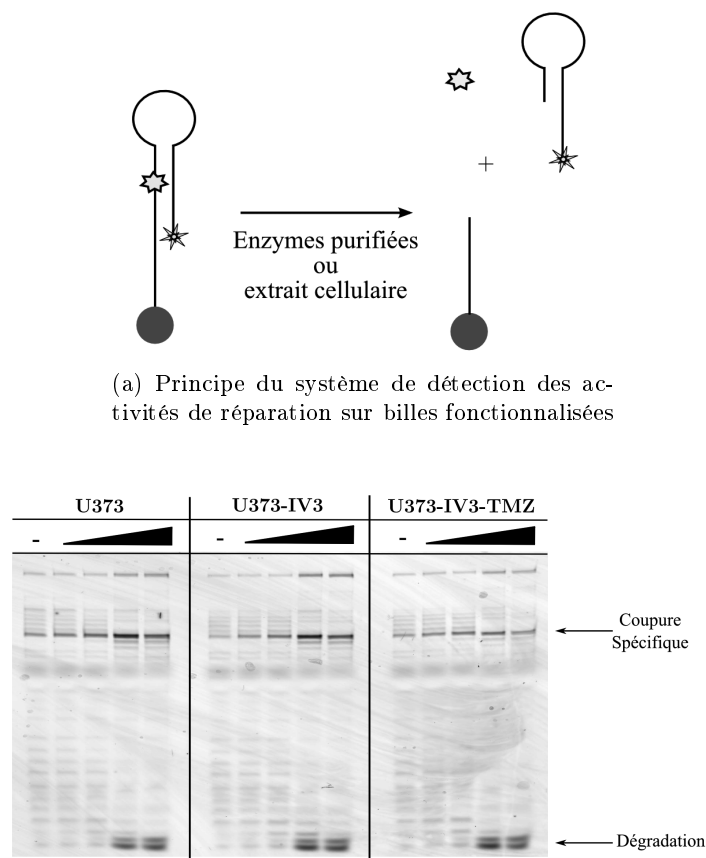


Figure 3.45 – Principe et résultats obtenus en utilisant le système de billes magnétiques fonctionnalisées

néanmoins procédé à une étude complémentaire à l'aide d'un autre test développé au laboratoire, non pas sur lame mais sur bille. Ce système repose sur un principe similaire à celui développé ici, avec des sondes oligonucléotidiques en hairpin immobilisées sur des billes magnétiques. Ainsi, ces billes fonctionnalisées avec des oligonucléotides portant la lésion Inosine ont été incubées avec ces mêmes extraits. La réaction enzymatique du couple Aag/Ape1 entraîne une coupure du lien phosphodiester, ce qui conduit à la déshybridation du duplex, le fragment contenant le fluorophore passant alors en solution (figure (3.45a), pour plus de détails sur le principe du test, voir le rapport de stage de Guillaume Gines en annexe B page 217). Les billes magnétiques sont alors culottées par un aimant et le surnageant est analysé sur gel d'électrophorèse (figure (3.45b)). Nous avons ainsi obtenu la même tendance que celle observée sur les lames, avec la présence d'une bande de coupure beaucoup plus faible pour la lignée U373-IV3-TMZ résultant d'une activité moindre de la glycosylase Aag.

L'ensemble de ces résultats est intéressant puisqu'il semble que ces trois lignées présentes des activités de la glycosylase Aag différentes. Notamment, il semble que l'activité de Aag soit très faible pour la lignée U373-IV3-TMZ, résistante au témozolomide. Néanmoins, d'autres expériences complémentaires sont à mener avant de conclure sur le lien direct entre la plus faible activité de la glycosylase Aag décrite ici et la résistance de ces cellules au TMZ.

Ainsi cette première application à un modèle cellulaire complexe, nous a permis de montrer la pertinence du biocapteur développé ici, pour la mesure des activités de réparation de l'ADN. En effet, en utilisant seulement trois lames fonctionnalisées, nous sommes capables de détecter les activités de trois enzymes, et ce pour trois lignées, en réalisant pour chacune une gamme de concentration. De plus, nous avons vu que l'activité de la glycosylase Aag est très faible au sein des extraits cellulaires et qu'elle est, dans ce cas, difficile à mesurer en solution du fait de la dégradation des sondes. La biopuce nous a permis de détecter cette activité aisément, pour des concentrations plus faibles que celles utilisées en solution, et sans qu'une dégradation ne gêne l'analyse.

3.2.2 Détection de l'activité de la O⁶-méthylguanine ADN-méthyle transférase, MGMT

La MGMT est, comme nous l'avons vu au chapitre 1, l'enzyme qui répare les alkylations en position O⁶ de la guanine ainsi qu'en position O⁴ de la thymine. Elle agit par réversion en transférant le groupement alkyle sur un de ces résidus cystéines, et est ensuite dégradée. Contrairement aux activités enzymatiques de la BER étudiées jusque là, cette voie de réparation ne fait pas intervenir d'incision du lien phosphodiester, si bien que les systèmes permettant sa détection diffèrent de ceux préalablement décrits.

3.2.2.1 Méthodes de détection de cette activité

Classiquement cette activité de réparation par réversion est détectée par une mesure radioactive au tritium [Wu *et al.*, 1987]. Le tritium est incorporé en incubant l'ADN avec un agent alkylant marqué comme la [³H]-méthyle-nitrosourée [Dolan *et al.*, 1990]. L'ADN méthylé est ensuite incubé avec l'enzyme purifiée ou avec un extrait cellulaire contenant cette dernière. La MGMT, qui transfère le groupement méthyle radioactif de l'ADN sur un de ses résidus cystéines, se retrouve ainsi marquée au tritium. La quantification de l'activité se fait alors par une analyse HPLC, couplée à une détection de la radioactivité, des bases de l'ADN hydrolysées ou de la protéine [Dolan *et al.*, 1990, Silber *et al.*, 1993, Nagel *et al.*, 2003, Major *et al.*, 1991].

D'autres méthodes ont également été développées. Nagel *et al.* ont notamment développé un système similaire à un test ELISA [Nagel *et al.*, 2003]. Pour cela ils ont introduit un dérivé biotinilé de la O⁶-benzylguanine dans la séquence d'un oligonucléotide. Lors de son action, la MGMT incorpore la biotine. Le tout est alors transféré sur une plaque ELISA recouverte de streptavidine, ce qui permet la fixation spécifique de la MGMT biotinilée. La détection se fait alors comme pour un ELISA, avec un anticorps primaire anti-MGMT et un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP qui permet la détection.

Une autre méthode, indirecte, consiste à insérer la lésion O⁶-méthylguanine (O6MeG) dans le site de restriction d'une enzyme de restriction. Il a été montré que la présence de cette lésion dans le site de certaines enzymes de restriction, comme *PvuII* ou encore *PstI*, inhibait leur action de coupure [Green *et al.*, 1984, Wu *et al.*, 1987]. Si cette fois, le groupement méthyle a été réversé sous l'action de la MGMT, le site de restriction est restauré et il est alors reconnu par l'enzyme de restriction qui réalise son action de coupure. Les premières utilisations de ce principe ont utilisé un marquage radioactif pour la révélation par gel d'électrophorèse ou par

chromatographie liquide haute performance [Wu *et al.*, 1987, Klein et Oesch, 1992]. Un test a d'ailleurs été commercialisé par Sigma-Aldrich utilisant des oligonucléotides contenant la lésion O6MeG dans le site de restriction de *PstI*. Pour ce kit, la révélation est réalisée par marquage initial des oligonucléotides au ^{32}P suivi d'une séparation par électrophorèse sur gel. Néanmoins, l'utilisation de la radioactivité complique ces tests et limite leurs applications.

Plus récemment, Moser *et al.* ont utilisé ce même principe mais avec une détection par fluorescence [Moser *et al.*, 2000]. Ainsi, la lésion O6MeG est insérée dans le site de restriction de l'enzyme *PvuII* qui, une fois la lésion réparée, génère des extrémités franches après coupure. L'enzyme *ExoIII* digère alors la sonde via l'extrémité 3' et libère un fluorophore préalablement introduit dans la séquence. Kreklau *et al.* ont également développé un test faisant intervenir un oligonucléotide marqué avec un fluorophore en 5' et contenant la lésion O6MeG dans le site de restriction de *PvuII* [Kreklau *et al.*, 2001].

Le problème majeur de ces tests utilisant le site de restriction d'une enzyme est qu'ils reposent sur l'utilisation de plusieurs enzymes dont les activités ne sont pas toujours optimales dans les mêmes tampons. Il est donc parfois nécessaire de trouver un tampon commun ou d'ajouter au protocole une étape intermédiaire de précipitation des oligonucléotides [Kreklau *et al.*, 2001]. De plus, l'activité de réversion étant directement proportionnelle à la quantité initiale de MGMT, lorsque l'on cherche à détecter cette activité au sein d'extraits cellulaires, il est nécessaire d'utiliser une importante quantité d'extrait. Ainsi, le volume de réaction est souvent assez important ($\sim 100\text{ }\mu\text{L}$) et il peut être intéressant de le réduire pour l'étape d'incubation avec l'enzyme de restriction. Enfin, la présence de nombreuses protéines au sein de l'extrait cellulaire peut gêner le bon fonctionnement de l'enzyme de restriction. Pour toutes ces raisons, il est intéressant de pouvoir changer de conditions de réaction entre les deux étapes clefs de réversion puis de coupure.

Ainsi, pour détecter cette activité de réparation de l'ADN il apparaît très pertinent d'utiliser un système supporté. En effet, la fonctionnalisation d'oligonucléotides sur un support solide permettrait de changer facilement les conditions de réaction entre les deux étapes sans avoir à précipiter l'ADN. Wilson *et al.* ont ainsi développé un test sur billes pour détecter l'activité de la MGMT [Wilson *et al.*, 1994]. Néanmoins, dans leur système, la détection se fait par une mesure de radioactivité du fragment oligonucléotidique relargué après action des deux enzymes.

3.2.2.2 Principe de la biopuce pour détecter l'activité enzymatique de la MGMT

Des études avaient été menées au préalable au laboratoire sur l'utilisation d'oligonucléotides hairpins pour la mesure de cette activité de réparation, à partir de l'enzyme purifiée, par une mesure de fluorescence [Chevry, 2007]. Dans ces études, le nucléotide endommagé avait été incorporé dans le site de restriction de l'enzyme *PstI*. L'oligonucléotide substrat utilisé était sous la forme d'une hairpin initialement quenchée et permettait la mesure de cette activité en solution. Nous avons donc repris ce système en combinant cette approche avec la biopuce mise au point précédemment pour la réparation par excision de base. Nous avons néanmoins conservé notre modèle de sonde substrat conduisant à une disparition de fluorescence.

Le principe de ce nouveau biocapteur est d'immobiliser sur un même bloc une sonde hairpin contenant la lésion O6MeG dans le site de restriction de l'enzyme *PstI*, une sonde contenant le site de cette enzyme, et une autre sonde non-lésée n'étant pas reconnue par *PstI*. Lorsque le biocapteur est incubé avec une solution contenant la MGMT, celle-ci reverse le groupement

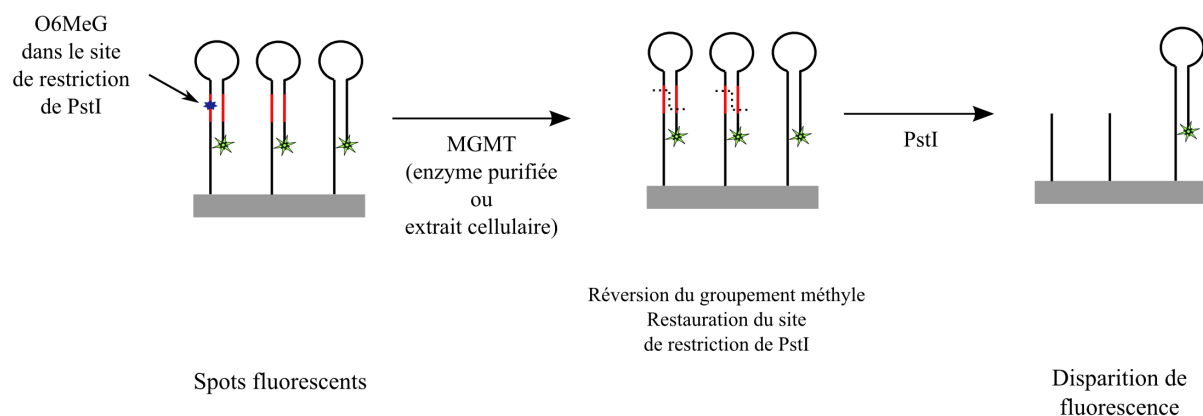


Figure 3.46 – Principe du biocapteur mis au point pour la détection de l'activité de la MGMT.

	Sonde	Séquence (5'→3')
Suivant la séquence PstI	HP PstI	X-TTT TTT TGA ACT GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	HP THF	X-TTT TTT TGA AC(THF) GCA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	HP Uracile	X-TTT TTT TGA ACT U CA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
	HP O6MeG	X-TTT TTT TGA ACT O6MeG CA GCT CCT TTTT AGG AGC TGC AGT TCA <i>cy3</i> T
Suivant la séquence EcoRI	HP EcoRI	X-TTT TTT TGA AGA ATT CCT CCT TTTT AGG AGG AAT TCT TCA <i>cy3</i> T
	HP Inosine	X-TTT TTT TGA AGA ITT CCT CCT TTTT AGG AGG AAT TCT TCA <i>cy3</i> T

Tableau 3.10 – Séquences des sondes pour la détection des activité de réparation des bases alkylées (rappel).

méthyle de la sonde lésée, restaurant ainsi le site de restriction. Le biocapteur est alors lavé et incubé avec une solution contenant l'enzyme *PstI* qui coupe le site de restriction restauré (coupure des sonde HP PstI et HP O6MeG "réparée") (figure (3.46)).

Ces nouvelles sondes ont ainsi été incorporées au biocapteur précédemment conçu (tableau (3.10)). La sonde témoin utilisée pour ces expériences est la sonde HP EcoRI qui possède le site de restriction de l'enzyme du même nom. Cette sonde n'est pas lésée et n'est pas reconnue par l'enzyme *PstI*, et consitue une référence interne. Nous avons également conservé la sonde HP THF, cette dernière servant de témoin, lors de l'incubation avec des extraits cellulaires, de la fonctionnalité des extraits. La sonde HP Uracile a également été utilisée, dans certains cas, selon les manipulations.

3.2.2.3 Activité enzymatique de la protéine purifiée

Dans un premier temps nous avons déterminé l'efficacité de coupure de l'enzyme *Pst*I sur lame. Pour cela, nous avons réalisé une gamme de concentration avec cette enzyme afin de nous assurer des conditions optimales pour obtenir une coupure spécifique du site de restriction. Nous avons constaté qu'un plateau est atteint avec 10 unités de cette enzyme (figure (3.47)). De plus, nous avons pu observer que celle-ci ne coupe ni la sonde HP THF ni la sonde HP O6MeG. La présence de ces deux lésions dans le site de restriction de *Pst*I inhibe l'action de celle-ci .

Bien que nous ayons observé, dans ces conditions opératoires, que 10 unités de *Pst*I suffisaient pour obtenir un maximum de coupure, nous avons pu constater quelques variations au cours de plusieurs expériences, selon les lots d'enzyme *Pst*I utilisés. Ainsi, nous avons choisi de nous placer, par la suite, en large excès de cette enzyme (15-20 U) afin de nous placer toujours dans des conditions optimales.

Nous avons ensuite testé notre système pour mesurer l'activité de l'enzyme purifiée MGMT. Nous avons ainsi incubé le biocapteur avec une gamme de concentration en MGMT dans son tampon de réaction avant de réaliser un lavage de la lame suivi d'une seconde incubation avec l'enzyme *Pst*I (quantité fixée).

Nous observons que quelle que soit la quantité de MGMT utilisée, l'hairpin HP *Pst*I est toujours coupée de manière similaire (figure (3.48a)). L'ajout de MGMT ne change en rien la coupure inexistante de la sonde THF. Nous observons, enfin, une coupure de la sonde HP O6MeG dépendante de la quantité de MGMT, ce qui est en accord avec ce que l'on attendait et valide le nouveau biocapteur. Nous avons vérifié cette dose-dépendance par une manipulation similaire en solution. Pour cela, nous avons incubé dans un premier temps la sonde HP O6MeG marquée au ^{32}P avec une gamme de MGMT dans son tampon, puis nous avons ajouté l'enzyme *Pst*I dans son tampon suivi finalement par une analyse PAGE (figure (3.48b)).

Nous remarquons qu'il est nécessaire d'utiliser une importante quantité de cette protéine MGMT afin d'observer une coupure, aussi bien en solution qu'en utilisant notre biocapteur. Notons néanmoins, qu'une unité de MGMT est dans ce cas défini, d'après le fournisseur de l'enzyme, comme étant la quantité nécessaire d'enzyme pour réverser 100 fmoles de O⁶-méthylguanine, contrairement aux autres enzymes utilisées jusque là (pour Ape1 et UNG, une unité d'enzyme correspondait à la quantité d'enzyme nécessaire pour transformer 1 pmole de substrat). L'importante quantité de MGMT nécessaire pour obtenir une réparation de la sonde HP O6MeG est conforme avec le fait que cette protéine agit une seule fois (enzyme "suicide") contrairement aux autres enzymes précédemment étudiées. La comparaison des résultats obtenus par analyse PAGE et sur notre biopuce, montre qu'à quantité égale de MGMT, le taux de coupure (rapporté au maximum pouvant être observé pour chaque système) est légèrement plus faible sur le biocapteur, mais reste du même ordre de grandeur.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence la fonctionnalité de notre test fluorescent sur support pour la détection de cette nouvelle activité de réparation, par réversion.

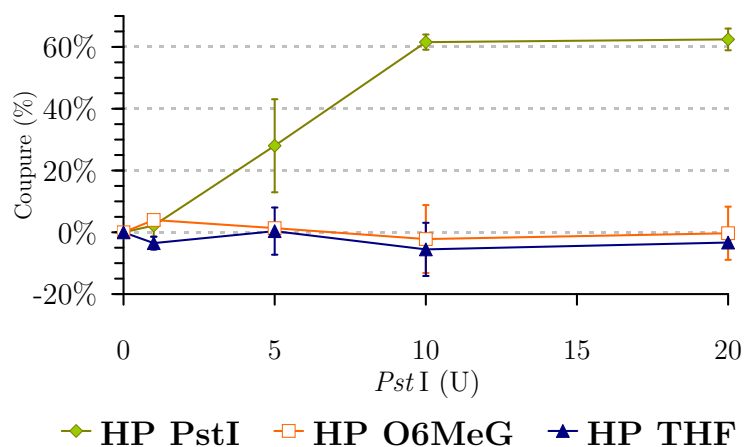


Figure 3.47 – Détection de la spécificité d'action de l'enzyme de restriction *PstI* sur lame.

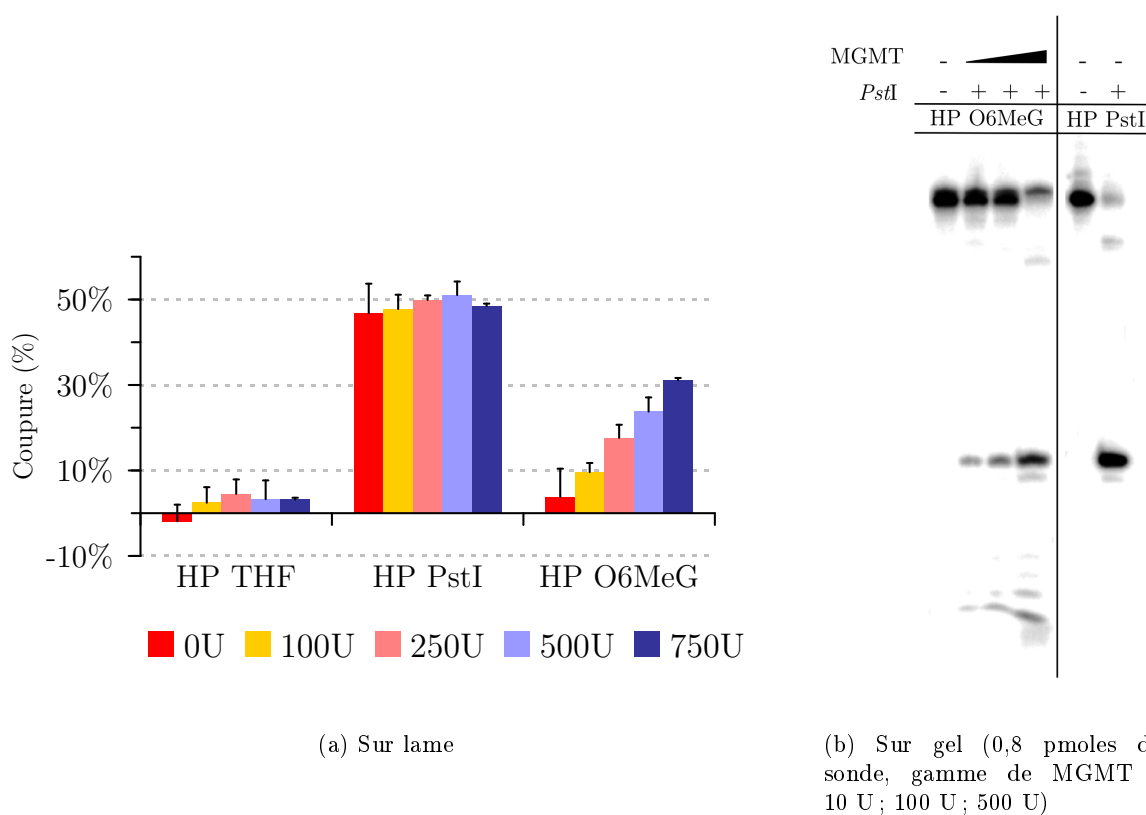
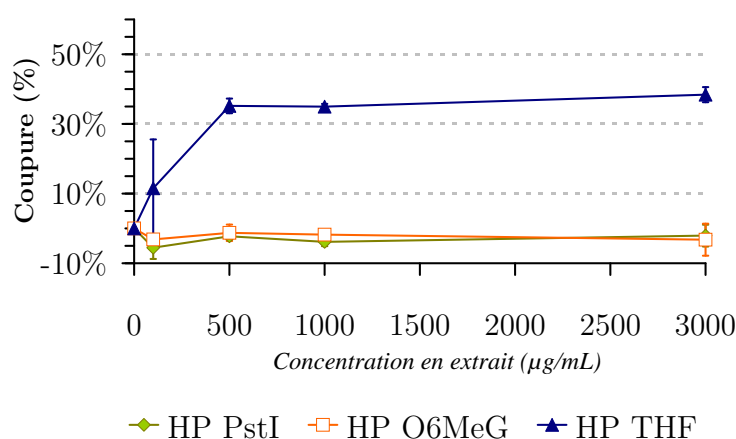


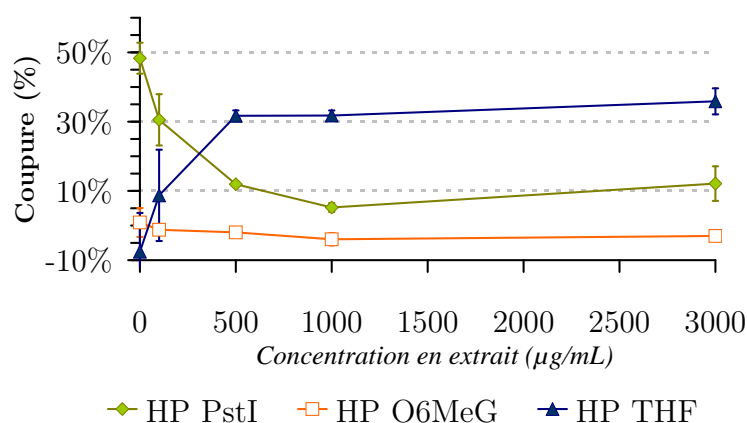
Figure 3.48 – Pourcentage de coupure sur lame après incubation avec une gamme de MGMT purifiée suivi d'une incubation avec l'enzyme de restriction *PstI* (15 U).

3.2.2.4 A partir d'extraits cellulaires

Nous avons ensuite cherché à détecter cette activité au sein d'extraits cellulaires. Pour cela nous avons procédé de manière similaire à ce que nous avons réalisé précédemment, pour les manipulations sur la BER. Nous avons ainsi incubé le biocapteur avec une gamme de concentration en extrait nucléaire HeLa plus haute que précédemment. Nous avons ensuite lavé le biocapteur avant de réaliser la seconde étape d'incubation avec l'enzyme *PstI*. Nous avons ainsi observé que le fait d'avoir réalisé une première incubation avec un extrait cellulaire inhibait l'action de la *PstI* (figure (3.49)). Une explication possible est qu'après incubation avec l'extrait, certaines protéines s'absorbent sur la surface ou encore se lient à la boucle des sondes, gênant l'activité de l'enzyme *PstI* lors de l'étape suivante ou encore conduisant à la déshybridation des sondes.



(a) Analyse de la coupure par une gamme de concentration en extrait nucléaire HeLa avant ajout de *PstI*.



(b) Analyse de la coupure par *PstI* après incubation avec une gamme de concentration en extrait nucléaire HeLa.

Figure 3.49 – Effet de l'incubation par une gamme de concentration en extrait nucléaire de cellules HeLa sur la coupure par *PstI* (20 U).

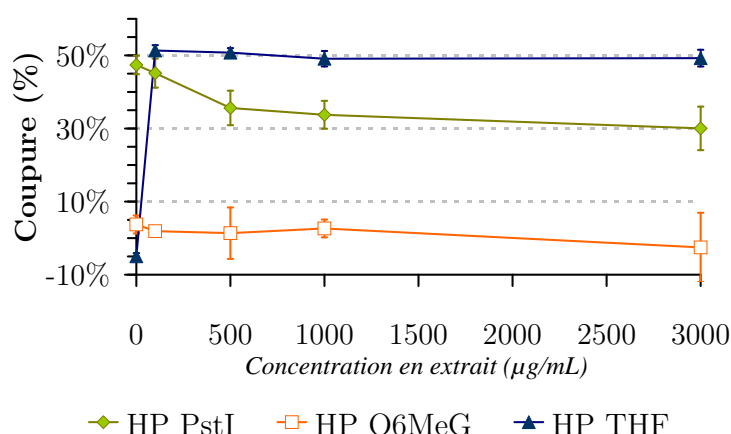


Figure 3.50 – Effet de l'ajout d'une étape intermédiaire de ré-hybridation, après l'incubation enzymatique, sur la coupure par *PstI* (20 U).

Afin de confirmer cette hypothèse et de remédier à ce problème, nous avons ajouté un nouveau cycle d'hybridation après la première étape d'incubation avec l'extrait cellulaire. Celui-ci consiste à incuber la lame avec du tampon d'hybridation pendant 1 h à 50 °C puis à réaliser une série de lavages.

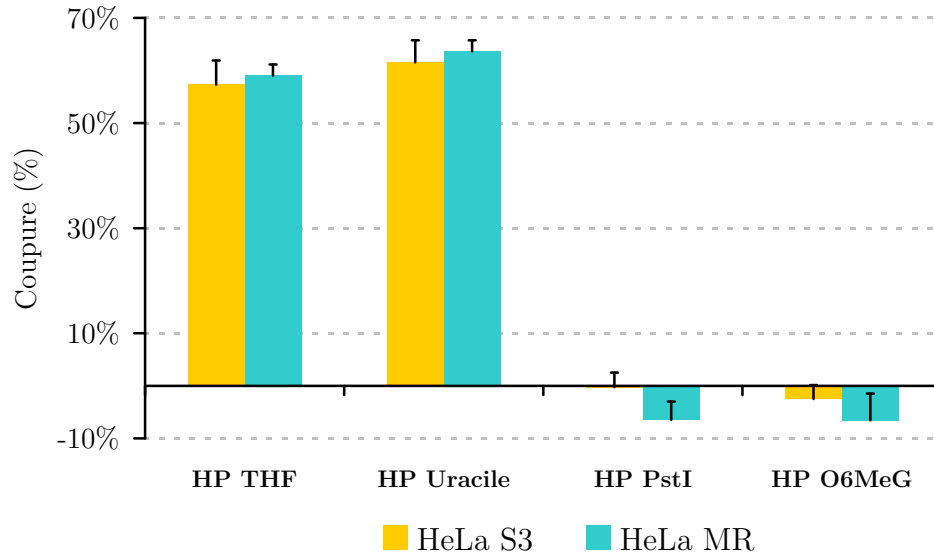
Comme l'indique la figure (3.50), l'ajout de cette étape a permis de restaurer quasi-intégralement la coupure de la sonde HP *PstI* par l'enzyme de restriction *PstI*. Néanmoins, dans ces conditions, nous n'avons pas été capables de détecter une coupure de la sonde HP O6MeG.

Notre hypothèse est que la gamme choisie n'est pas adaptée à la détection de cette activité enzymatique. En effet, comme nous l'avons déjà évoqué, cette protéine est présente à faible concentration dans les cellules et son activité n'est pas catalytique. De plus, nous ne connaissons pas la concentration en MGMT à l'état basal des extraits nucléaires HeLa dont nous disposons. Afin de poursuivre notre étude et valider notre biocapteur, nous avons donc initié une collaboration avec l'équipe du professeur B. Kaina (Mainz, Allemagne), qui nous a fourni des extraits totaux de cellules surexprimant la MGMT (HeLa S3) et de cellules déficientes (HeLa MR) [Nagel *et al.*, 2003].

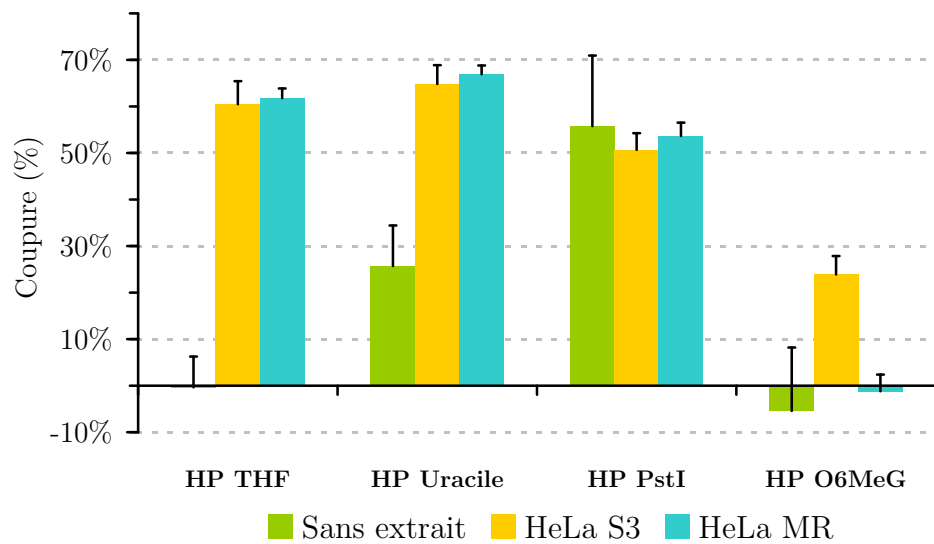
Nous avons donc incubé une lame avec une quantité plus importante d'extrait (200 µg dans 100 µL). Nous avons ainsi pu contrôler que, dans ces conditions, seules les sondes HP Uracile et HP THF sont coupées contrairement aux sondes HP *PstI*, et HP O6MeG (figure (3.51a)).

Nous avons ensuite lavé la lame afin d'éliminer les extraits cellulaires, puis réalisé un nouveau cycle d'hybridation. Le biocapteur a alors été incubé avec ou sans l'enzyme *PstI* dans son tampon. Nous observons ainsi une coupure de la sonde HP *PstI* semblable pour les deux extraits cellulaires (figure (3.51b)). De plus, ce pourcentage de coupure est du même ordre de grandeur que celui obtenu pour les blocs de la lame incubés sans extrait cellulaire (traité uniquement avec le tampon de MGMT lors de la première étape).

Nous remarquons également que la présence de l'uracile dans le site de restriction de *PstI* n'inhibe pas complètement l'action de cette dernière contrairement aux lésions THF et O6MeG comme nous l'avons vu précédemment (figure 3.47 page 130). Cette observation est conforme



(a) Pourcentages de coupure obtenus après incubation avec les extraits cellulaires (1 h 30, 37 °C).



(b) Pourcentages de coupure obtenus après incubation avec les extraits cellulaires puis avec l'enzyme de restriction *PstI* (20 U, 1 h, 37 °C).

Figure 3.51 – Pourcentages de coupure sur lame obtenus après incubation avec des extraits totaux de cellules HeLa S3 ou HeLa MR ou uniquement avec du tampon enzymatique, suivie de l'incubation avec *PstI* (20 U).

avec ce que l'on a pu constater par analyse PAGE après incubation de la sonde HP Uracile avec cette enzyme de restriction (figure (3.52)).

Concernant la sonde HP O6MeG, nous constatons que celle-ci n'est pas coupée lorsqu'elle est incubée avec l'enzyme *PstI* seule. De même, nous n'observons pas de coupure lorsqu'elle est incubée avec l'extrait de cellules HeLa MR. Nous observons néanmoins une coupure ($\sim 24\%$) pour l'extrait HeLa S3. Cette observation est conforme à ce que l'on peut attendre, puisque nous obtenons bien une coupure sélective avec l'extrait surexprimant la MGMT (HeLa S3) tandis que nous n'en observons pas avec l'extrait déficient pour cette protéine (HeLa MR).

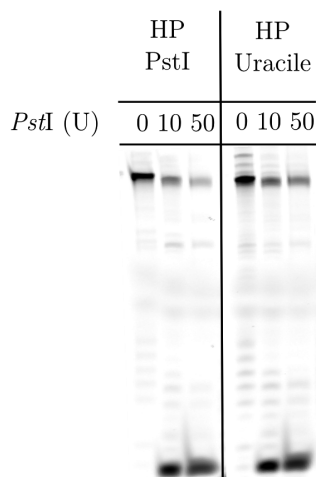


Figure 3.52 – Analyse PAGE de la coupure des sondes HP *PstI* et HP Uracile par l'enzyme de restriction *PstI*.

Nous avons donc validé notre microsystème pour la détection de cette activité enzymatique au sein d'un extrait total surexprimant la MGMT. D'autres expériences sont néanmoins nécessaires afin d'optimiser les conditions de réaction, principalement en terme de quantité d'extrait à utiliser. Nous pourrions ainsi déterminer plus précisément la sensibilité de ce test et l'appliquer à la détection de cette activité au sein d'extraits "normaux", ne surexprimant pas cette enzyme.

3.3 Conclusions

Nous avons développé un nouveau biocapteur nous permettant de mesurer les activités enzymatiques de coupure de l'ADN liées à la réparation de certains dommages, par une mesure de fluorescence.

Nous avons tout d'abord appliqué ce principe à la détection des activités de réparation de la voie par excision de base puis l'avons adapté afin d'étudier la réparation par réversion. Nous avons ainsi été en mesure de détecter l'activité de la glycosylase UNG, et de l'AP-endonucléase Ape1 au sein d'un extrait cellulaire. Ce nouveau biocapteur nous a également permis de mesurer l'activité de la glycosylase Aag pourtant faiblement exprimée. Un des bénéfices notables de l'utilisation d'un microsystème supporté est la diminution significative de la dégradation des sondes lors des incubations avec des extraits cellulaires, contrairement à ce que l'on peut obtenir lors des mesures en solutions. Il apparaît clairement que le support auquel sont greffées les sondes apporte une protection vis-à-vis des nucléases présentes dans les extraits cellulaires. Ceci

est particulièrement intéressant pour les études des activités de réparation de l'ADN faiblement exprimées pour lesquelles il est nécessaires d'utiliser des concentrations en extraits élevées. Dans le cas, par exemple, de la MGMT, l'activité de cette protéine n'étant pas catalytique et celle-ci étant faiblement exprimée, il est nécessaire d'utiliser des quantités conséquentes d'extrait cellulaire pour détecter son activité. L'augmentation de la quantité d'extrait à analyser induit directement une augmentation de la quantité de nucléases auxquelles sont exposées les sondes. C'est pourquoi l'analyse en solution d'une telle activité peut être gênée par la dégradation par les nucléases et ainsi rendre sa détection difficile.

L'utilisation d'un tel biocapteur simplifie significativement les manipulations biologiques par rapport aux techniques traditionnelles d'analyse PAGE. Tout d'abord, la détection par fluorescence facilite grandement les manipulations par rapport à l'utilisation "historique" de la radioactivité. De plus, sur un seul biocapteur nous sommes actuellement capables de détecter six conditions différentes pour plusieurs lésions cibles. Il est tout à fait envisageable d'augmenter encore le nombre de conditions expérimentales étudiées par lame en augmentant la densité de celle-ci et en concevant de nouveaux "caches" délimitant les chambres d'incubation. A ce jour, nous avons incorporé les substrats uracile, THF, inosine et O⁶-méthylguanine. Nous pouvons toutefois envisager d'augmenter encore le nombre de sondes substrats immobilisées de sorte à détecter d'autres activités de réparation au sein d'un même échantillon. Ainsi cette technique supportée requiert beaucoup moins de matériel biologique pour détecter plusieurs activités enzymatiques. Ainsi, même si la sensibilité de ce test est légèrement plus faible que ce que nous avons pu observer en solution par analyse PAGE fluorescente, la parallélisation des activités mesurées rend cet outil particulièrement attractif. De plus, la détection est beaucoup plus rapide puisqu'il suffit d'incuber le biocapteur avec l'échantillon à analyser et de quantifier le signal sur un scanner de fluorescence. Lorsque l'on réalise une expérience similaire en solution par analyse PAGE, il est nécessaire d'incuber au préalable l'oligonucléotide avec la solution enzymatique avant de réaliser une séparation des fragments nucléiques sur un gel d'acrylamide que l'on révèle ensuite. Pour analyser plusieurs activités enzymatiques à partir de plusieurs échantillons la manipulation devient très vite fastidieuse. A titre d'exemple, si l'on souhaite réaliser une gamme de concentration d'un extrait sur six points pour les activités des enzymes UNG et Ape1, cela représente déjà 6x2 échantillons pour un seul réplicat, alors que cette étude peut être réalisée sur une seule lame pour laquelle nous disposons de deux réplicats. Cependant, la détection de plusieurs activités enzymatiques au sein d'un même échantillon nécessite l'utilisation d'un tampon enzymatique commun. Or, nous avons vu que les activités de certaines enzymes sont optimales dans des conditions différentes [Kreklau *et al.*, 2001]. Il est donc important de prendre en compte ce paramètre et d'ajuster les conditions opératoires en fonction de l'analyse que l'on souhaite réaliser.

Nous avons également démontré le potentiel d'un tel système pour l'étude d'inhibiteurs de la réparation. Dans ce cas précis, il semble très compliqué d'utiliser un test en solution par analyse PAGE pour réaliser un screening de nombreuses molécules. Le nouvel outil développé ici semble dans ce cas particulièrement adapté.

De même, nous avons vu que ce système est pertinent pour détecter l'activité de réversion de la MGMT. Cette enzyme est particulièrement intéressante à étudier puisqu'un lien a été établi entre la méthylation du promoteur de son gène ainsi que son expression et la réponse aux traitements chimiothérapeutiques alkylants [Stupp *et al.*, 2007, Brell *et al.*, 2005]. Néanmoins,

très peu d'études ont corrélé son activité avec la sensibilité des tumeurs aux traitements chimiothérapeutiques [Naumann *et al.*, 2009]. Contrairement à la BER, très peu de méthodes sont actuellement disponibles pour mesurer facilement l'activité enzymatique de cette enzyme. Cette activité de réparation ne conduit pas à une coupure directe, ce qui rend les analyses par PAGE difficiles. C'est pourquoi, encore aujourd'hui, le test préférentiellement utilisé consiste à marquer radioactivement l'ADN et à l'analyser par chromatographie liquide par détection radioactive des bases hydrolysées. Une astuce a été utilisée, qui consiste à introduire la lésion substrat de cette enzyme dans le site d'une enzyme de restriction [Wu *et al.*, 1987]. Néanmoins, si l'on souhaite réaliser cette manipulation en solution, cela suppose une compatibilité des tampons enzymatiques des deux enzymes ciblées ou encore de rajouter une étape intermédiaire de précipitation de l'ADN. Ainsi, l'utilisation d'un support semble tout à fait pertinente et permet de s'affranchir de ce problème puisqu'il est alors possible de rincer les sondes entre les deux étapes enzymatiques, afin de changer de tampon. Le biocapteur nous a permis de détecter cette activité à partir de l'enzyme purifiée mais également au sein d'un extrait cellulaire surexprimant cette enzyme. Nous avons ainsi pu distinguer un extrait surexprimant d'un extrait déficient en MGMT. Néanmoins, d'autres expériences restent nécessaires afin d'optimiser ce test. Il faudrait notamment définir les quantités optimales d'extrait nécessaires à la détection, vérifier les paramètres d'incubation (tampon enzymatique, durée de l'incubation) et établir une limite de sensibilité du système en analysant différents extraits cellulaires exprimant cette protéine à différents taux.

Nous avons néanmoins constaté certaines limitations de ce système. En effet, nous avons pu établir qu'une partie des sondes immobilisées n'était pas fonctionnelle. Diverses approches ont été employées afin de mieux comprendre cette limitation et rendre ces sondes plus accessibles, mais n'ont néanmoins pas donné les résultats escomptés. Des développements supplémentaires seraient nécessaires afin d'améliorer encore les performances du test.

De plus, nous avons rencontré des problèmes de reproductibilité des lames, en particulier pour les sondes en duplex. L'utilisation des sondes en hairpin nous a permis de réduire considérablement ces problèmes de reproductibilité. En effet, nous obtenons ainsi généralement des coefficients de variation de l'ordre de 10 %. La fonctionnalisation reste un point délicat dans la réalisation et l'utilisation de cet outil. De ce fait, lorsque nous obtenons un lot "correct" de lames, notre technologie permet la détection d'activités faibles de coupure, néanmoins dans certains cas, bien que le protocole suivi soit le même, nous obtenons des lots de lames moins performants indépendamment de l'échantillon biologique étudié. Ainsi, il serait intéressant de réduire les paramètres générant de la variabilité, notamment lors de la silanisation. Jusqu'à présent, l'incorporation des fonctions azotures se faisait en deux étapes, puisqu'aucun silane azoture fonctionnel n'était disponible. Un nouveau silane azoture vient néanmoins d'être commercialisé et son utilisation pourrait permettre de diminuer encore les problèmes de reproductibilité. Un autre point délicat concerne le spotting des sondes. En effet, le robot utilisé est parfois "capricieux" et peut rendre cette étape très délicate voire pénible. Ainsi, il arrive parfois que certains échantillons ne soient pas déposés, ou qu'il génère des spots satellites, ou encore que les spots se chevauchent.

Des expériences seraient également à mener pour étudier le vieillissement et la conservation des lames. En effet, jusqu'à présent les lames sont produites au coup par coup selon les manipulations que nous souhaitons réaliser. Ainsi aucune lame n'est conservée pour une utilisation ultérieure. Nous avons néanmoins pu constater une baisse de la qualité des lames à partir d'une

semaine après le spotting initial. Il serait donc important d'étudier plus en détail ce point et de voir s'il est possible d'améliorer la conservation des lames, de telle sorte qu'il soit possible de faire un spotting unique et d'utiliser les lames sur plusieurs semaines.

La méthode que nous avons utilisée permet la détection des activités de coupure par la mesure d'une disparition de fluorescence. Cette technique peut cependant poser certains problèmes puisqu'il est nécessaire de vérifier que cette disparition est bien spécifique de l'activité ciblée et qu'elle ne résulte pas d'un artéfact quelconque tel qu'un décrochage des sondes ou encore une dégradation de celles-ci. C'est pour cela que nous avons systématiquement incorporé une sonde témoin non-lésée utilisée comme référence interne et qui permet de vérifier ce point. Dans notre cas, il semble que les processus de dégradation soient minimes. Il pourrait néanmoins être intéressant de mettre au point un système similaire mais induisant une apparition de fluorescence. Nous avons, dans ce but, réalisé des premières expériences d'immobilisation de sondes hairpins quenchées. Néanmoins, ces études préliminaires ne nous ont pas permis de mettre en évidence un quenching suffisant sur lame dans nos conditions. C'est pourquoi d'autres développements seront à envisager pour mettre au point un tel système. Une voie d'investigation serait d'utiliser un autre quencheur et de s'assurer d'un meilleur appariement des sondes hairpin, afin de ne pas "bruiter" les mesures de fluorescence. Il sera également peut-être nécessaire de revoir le design des sondes. Fang *et al.* ont, par exemple, immobilisé une sonde "molecular beacon" sur un support via un linker non pas dans la continuité de la séquence, mais parallèlement à celle-ci (figure (3.53)) [Fang *et al.*, 1999]. De plus, nous pourrions rigidifier le linker reliant la sonde à la lame, ce qui pourrait permettre de mieux orienter les sondes (perpendiculaires à la surface). Il se pourrait aussi que ce faible quenching soit dû à une trop grande densité des sondes. Du *et al.* ont utilisé une molecular beacon pour détecter une hybridation et, dans ce cas, ils n'ont pas observé d'augmentation de fluorescence après hybridation de la sonde molecular beacon avec la cible [Du *et al.*, 2005]. Ils ont relié ce résultat à une trop forte densité des sondes à la surface des lames et ont montré qu'en diminuant celle-ci, ils obtenaient de meilleurs résultats. Ainsi, nous pourrions approfondir les études menées pour diminuer la densité des sondes et déterminer si ce paramètre a un effet sur le quenching de fluorescence des sondes immobilisées.

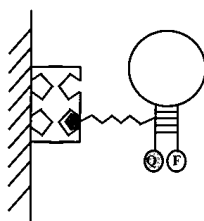


Figure 3.53 – Stratégie d'immobilisation d'une molecular beacon d'après [Fang *et al.*, 1999].

Enfin, bien que ce système de biopuces apporte de nombreux avantages, la préparation de celles-ci reste relativement lourde à mettre en oeuvre. Tout d'abord la fonctionnalisation des

lames par les groupements azotures nécessite deux étapes soit 48 heures de réaction. Il est ensuite nécessaire de spotter les oligonucléotides et de laisser la réaction de greffage se produire durant une nuit. De plus, l'utilisation de biopuces nécessite d'être en possession des équipements relatifs à leur fabrication, à la quantification des signaux de fluorescence, en particulier le robot "spotteur" et le scanner de fluorescence de lames. Ceci peut limiter le possible développement d'une telle technique dans certains laboratoires. Ainsi, dans le cas de développements de tels biocapteurs à des fins cliniques, un investissement important pour les organismes acquéreurs serait nécessaire. C'est pourquoi un second système sous le format de billes fonctionnalisées a été envisagé dont l'utilisation requiert uniquement des appareils couramment utilisés dans les laboratoires (voir rapport de Guillaume Gines en annexe B page 217). Des recherches sont en cours concernant la mise au point de ce nouvel outil, qui pourrait permettre de s'affranchir des limitations liées aux lames tout en conservant les bénéfices de l'utilisation d'un support solide.

Chapitre 4

Sondes oligonucléotidiques paramagnétiques pour l'étude structurale des lésions de l'ADN par RPE pulsée

Sommaire

4.1	La RPE pulsée pour l'étude des structures de l'ADN	140
4.2	Contexte général et objectifs de l'étude	143
4.2.1	Stratégies de marquage de l'ADN pour les études de RPE pulsée	143
4.2.2	Objectifs de l'étude	146
4.3	Étude de la stratégie de marquage de l'ADN par chimie click . . .	146
4.3.1	Marquage radicalaire par chimie click	147
4.3.2	Mesures des températures de fusion des duplex bi-marqués	148
4.3.3	Mesures des distances par RPE pulsée	150
4.4	Détection de déformations induites par des lésions de l'ADN	153
4.4.1	Mesure du changement structural induit par le THF	153
4.4.2	Mesure du changement structural induit par des adduits platinés	155
4.5	Application à un système complexe en "triangle"	163
4.5.1	Élaboration et étude d'un duplex d'ADN tri-marqué	163
4.5.2	Application à la détection d'une interaction ADN-protéine	166
4.6	Conclusions	168

Parallèlement au développement de la biopuce pour détecter les activités de réparation de l’ADN, nous avons développé de nouvelles sondes nucléiques pour étudier, par résonance paramagnétique pulsée, les modifications structurales induites par certaines lésions de l’ADN. Au cours de ce chapitre nous verrons donc le développement de ces nouvelles sondes ainsi que l’étude de plusieurs lésions de l’ADN et nous verrons qu’un tel système a pour la première fois été appliqué à la détection d’une activité enzymatique.

4.1 La RPE pulsée pour l’étude des structures de l’ADN

La structure de l’ADN, ainsi que la déformation induite par des lésions, ont fortement été étudiées par résonance magnétique nucléaire (RMN), diffraction des rayons X ou encore par transfert d’énergie de fluorescence (FRET) [Lukin et de Los Santos, 2006, Spingler *et al.*, 2001, Norman *et al.*, 2000]. Chacune de ces méthodes possède néanmoins d’importantes limitations.

Par exemple, la RMN ne permet l’étude que de petites molécules puisqu’elle est limitée à des distances entre les protons inférieures à 5 Å (12 Å selon la méthode employée) [Lukin et de Los Santos, 2006]. De plus cette technique nécessite d’importantes quantités de la molécule à étudier (autour de la μmol dans un volume d’environ 500 μL), ce qui peut être une difficulté dans l’étude des biomolécules [vanBoom *et al.*, 1996, Dunham *et al.*, 1998].

La limitation principale de la technique de diffraction des rayons X concerne l’obtention des cristaux nécessaires à la mesure. En effet, la formation de cristaux exploitables est très délicate et peut considérablement allonger le temps de préparation de l’échantillon.

Le FRET a également été utilisé pour mesurer des distances, “ R ”, séparant deux fluorophores (un donneur et un accepteur). Cette méthode permet d’étudier des distances entre 10 Å et 100 Å entre les deux fluorophores [Norman *et al.*, 2000, Dietrich *et al.*, 2002]. L’efficacité du FRET mesurée est reliée à la distance séparant les deux fluorophores par la formule suivante :

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \quad (4.1)$$

où R_0 est la distance caractéristique de Förster pour une paire donneur-accepteur pour laquelle E_{FRET} est égale à 0,5. Cette méthode requiert certaines précautions concernant la séquence d’ADN étudiée. En effet, il est connu que les fluorophores sont sensibles à leur environnement électronique et notamment que certaines bases de l’ADN peuvent augmenter ou au contraire “quencher” l’émission du fluorophore [Marras *et al.*, 2002]. L’utilisation de cette technique nécessite un double marquage avec deux molécules différentes : le donneur de fluorescence et l’accepteur de fluorescence. De plus, les fluorophores sont généralement de taille importante et peuvent gêner le bon appariement des bases de l’ADN (exemple illustré sur la figure (4.1), d’après [Dietrich *et al.*, 2002]). Des analogues fluorescents de nucléotides sont néanmoins développés afin de réduire cet encombrement stérique (voir [Wachowius et Höbartner, 2010] pour une revue).

Une technique de Résonance paramagnétique électronique, RPE, pulsée a récemment été appliquée pour l’étude structurale des biomolécules. Tout comme la RMN, de nombreuses séquences de pulses d’excitation ont été développées. Dans notre cas, la séquence utilisée est nommée DEER,

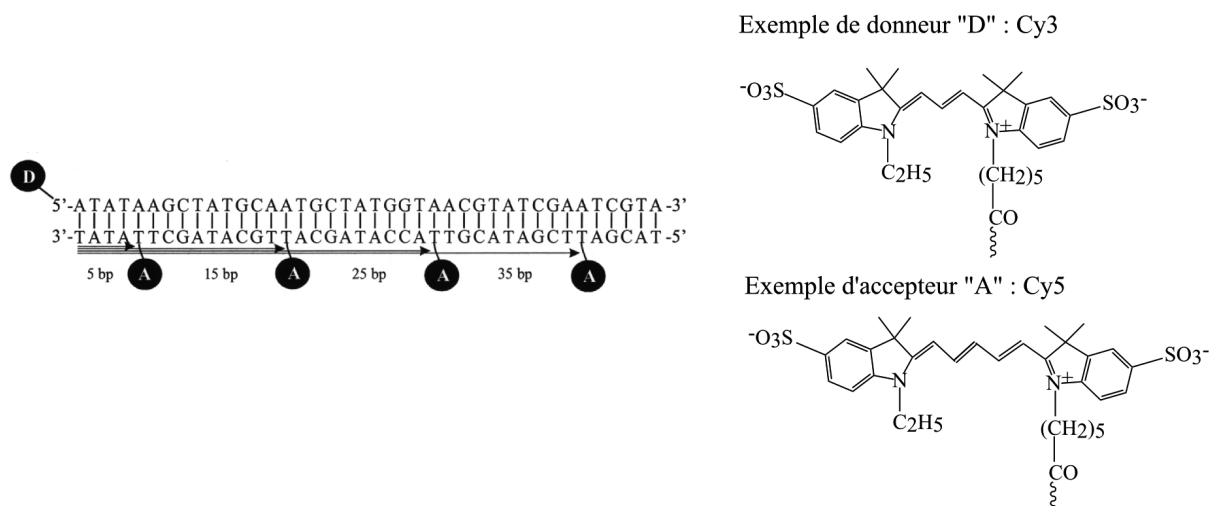


Figure 4.1 – Exemple de molécules utilisées pour l'étude de duplex d'ADN par FRET, d'après [Dietrich *et al.*, 2002].

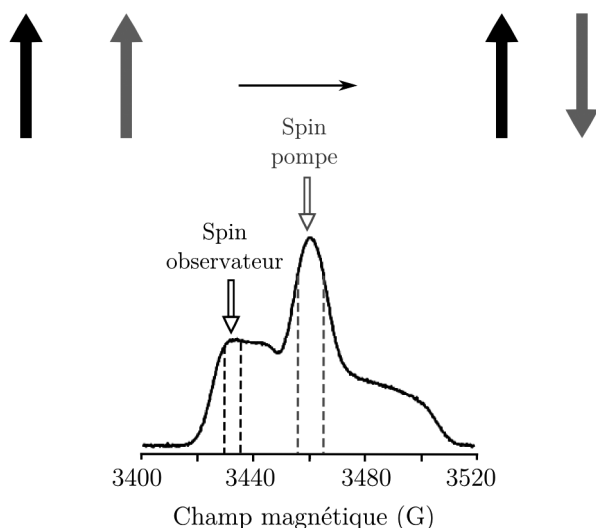


Figure 4.2 – Principe schématique de l'excitation en RPE d'un nitroxyde.

pour “double electron-electron resonance”, ou encore PELDOR, pour “pulsed electron double resonance” [Jeschke, 2002].

Cette technique repose sur l'interaction dipolaire entre les moments magnétiques associés aux spins de deux centres paramagnétiques, en général des radicaux. Le principe général est d'observer l'effet du champ magnétique créé par un des centres paramagnétiques sur le second. Pour cela, on excite spécifiquement le spin appelé “pompe” (en rouge sur la figure (4.2)) et on mesure le signal obtenu sur le deuxième spin (“observateur”, en bleu sur la figure (4.2)), appelé “écho”. Les propriétés des deux spins n'étant pas exactement identiques, on excite spécifiquement les spins “pompe” et “observateur” en utilisant deux fréquences différentes pour les pulses RPE. Cela revient à sélectionner les spins “pompe” et “observateur” dans deux régions différentes du spectre RPE (figure (4.2)).

Ainsi, l'intensité du signal mesuré (V), appelé “écho” (formule (4.2)) permet de déterminer la distance, d , qui sépare les deux spins (λ est une constante appelée paramètre de profondeur de

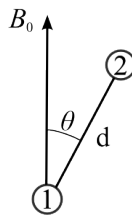


Figure 4.3 – Représentation schématique de la signification de l'angle θ , entre le vecteur qui relie les deux spins (1 et 2) et le champ magnétique appliqué (B_0).

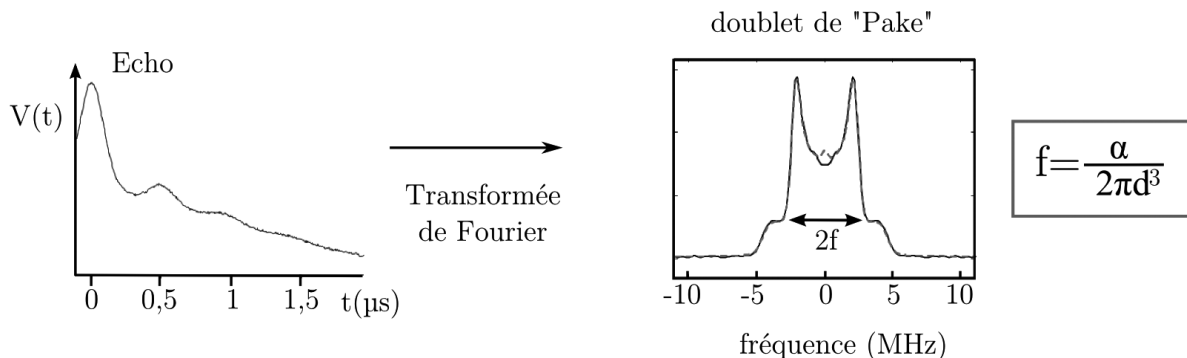


Figure 4.4 – Signal de l'écho ($V(t)$) obtenu par RPE pulsée et correspondance avec la distance, d , séparant les deux spins électroniques.

modulation). En effet, le signal V des spins “observateur” oscille à une vitesse de rotation (ω_{dd}) donnée par la formule (4.3), où θ est l'angle entre le vecteur qui relie les deux spins et le champ magnétique appliqué (figure (4.3)) et, α une constante dépendante de la nature des sondes de spin (identique pour deux spins $1/2$ de radicaux nitroxydes). D'après cette formule la vitesse de rotation ω_{dd} est proportionnelle à $1/d^3$. On peut ainsi constater la dépendance de cette vitesse de rotation avec la distance, d , séparant les deux spins.

$$V = 1 - \lambda [1 - \cos(\omega_{dd}t)] \quad (4.2)$$

$$\omega_{dd} = \alpha \frac{(3\cos^2(\theta) - 1)}{d^3} \quad (4.3)$$

Les mesures de RPE pulsée étant réalisées après congélation de l'échantillon liquide, les molécules qu'il contient sont figées. Ainsi, si l'on considère l'ensemble des molécules présentes dans le produit étudié, le vecteur reliant les deux spins peut prendre toutes les orientations et donc θ peut prendre toutes les valeurs comprises entre 0 et π . La distribution en ω_{dd} peut prendre la forme d'un doublet de “Pake”. La fréquence caractéristique, f , calculée après transformée de Fourier du signal mesuré est inversement proportionnelle au cube de la distance séparant les deux spins (figure (4.4)). Un traitement mathématique, dans notre cas appelé régularisation de Tikhonov, permet alors d'obtenir la distribution des distances séparant les deux spins [Chiang *et al.*, 2005].

Cette technique de RPE pulsée permet d'étudier des distances allant de 1,5 nm à 6-8 nm, selon la séquence d'excitation utilisée [Jeschke, 2002], et nécessite des quantités raisonnables

d'échantillon à analyser, typiquement 3 nmoles dans un volume de 60 μL . Cette technique, tout comme la technique de FRET nécessite l'introduction de marqueurs, dans ce cas paramagnétiques, en général des radicaux, au sein de la molécule d'ADN. Néanmoins ces radicaux sont en général de petites tailles, contrairement aux fluorophores utilisés dans le FRET, et modifient ainsi moins la structure de la molécule étudiée.

La RPE pulsée a été utilisée notamment, pour l'étude de protéines [Borbat *et al.*, 2002], ou encore de duplex d'ADN [Schiemann *et al.*, 2007]. De plus, cette technique a récemment été employée dans notre groupe pour étudier différentes conformations d'ADN. Sicoli *et al.* ont ainsi montré le potentiel de cette méthode pour mesurer les changements de conformation entre deux des formes de l'ADN : ADN-A et ADN-B [Sicoli *et al.*, 2008]. De plus, utilisant la RPE pulsée, ils ont observé les changements structuraux de la molécule d'ADN induits par certaines bases modifiées de l'ADN comme la 8-oxoG ou encore divers analogues de sites abasiques [Sicoli *et al.*, 2009].

4.2 Contexte général et objectifs de l'étude

4.2.1 Stratégies de marquage de l'ADN pour les études de RPE pulsée

Nous avons vu que la RPE pulsée permettait de mesurer la distance entre deux spins électroniques. Ainsi, la détermination correcte de distances par cette technique dépend directement de la qualité du marquage employé. L'introduction ciblée de marqueurs de spin (centres paramagnétiques) au sein des molécules est connue sous le nom de "site-directed spin labeling" (SDSL). Pour l'étude de l'ADN et de l'ARN, les centres paramagnétiques sont très souvent des dérivés radicalaires nitroxydes, chimiquement inertes et stables [Wachowius et Höbartner, 2010]. Les nitroxydes peuvent être introduits au sein de l'ADN sur le phosphate reliant les nucléotides, sur le sucre ou encore sur les bases. Diverses stratégies de marquage ont été utilisées pour introduire ces radicaux.

Les nitroxydes peuvent, par exemple, être insérés au cours de la synthèse chimique sur support des oligonucléotides à l'aide de phosphoramidites. Schiemann *et al.* ont utilisé cette stratégie pour marquer de l'ADN sur une thymine avec un radical (nucléotide correspondant présenté sur la figure (4.5)) [Schiemann *et al.*, 2007]. De même, Barhate *et al.* ont développé un phosphoramidite dérivé, contenant un nitroxyde sur une guanine modifiée (nucléotide correspondant présenté sur la figure (4.5)) [Barhate *et al.*, 2007]. Néanmoins, au cours de la synthèse chimique sur support, les radicaux peuvent se décomposer et cette méthode peut nécessiter des modifications du cycle normal de synthèse et devenir ainsi délicate et fastidieuse.

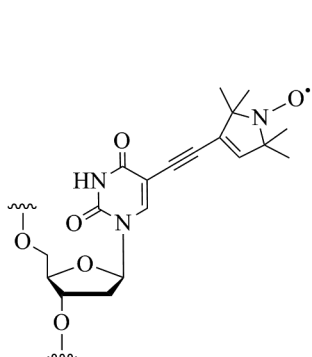
Grant *et al.* ont, eux, utilisé une réaction enzymatique afin de marquer un oligonucléotide à l'extrémité 5'. A l'aide de la T4 kinase ils ont inséré un groupement phosphorothioate en 5' qu'ils ont ensuite fait réagir avec un radical nitroxyde contenant une fonction iode (nucléotide correspondant présenté sur la figure (4.5)) [Grant et Qin, 2007]. Cette technique nécessite néanmoins deux étapes ainsi que l'utilisation d'une enzyme et ne permet le marquage qu'en 5' de la séquence oligonucléotidique.

Une stratégie beaucoup plus répandue est d'insérer, au cours de la synthèse de l'oligonucléotide, un nucléotide modifié que l'on fait ensuite réagir avec un marqueur de spin adéquat. Edwards *et al.* ont, par exemple, marqué un oligonucléotide sur le sucre en utilisant un dérivé 2'-amino-uridine qu'ils ont fait réagir avec un dérivé isocyanate du radical nitroxyde TEMPO

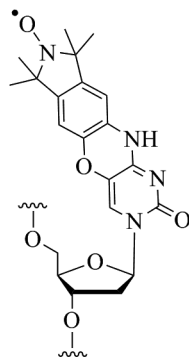
(2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-N-oxyle), (nucléotide correspondant présenté sur la figure (4.5)) [Edwards *et al.*, 2001]. Piton *et al.* ont également utilisé des nucléotides modifiés, mais cette fois pour marquer un oligonucléotide d’ARN sur une des bases. Ils ont ainsi inséré les nucléotides 5-iodo-uridine, 5-iodo-cytidine et 2-iodo-adénosine dans la séquence. Les fonctions iodures ont alors été substituées par un dérivé alcyne d’un nitroxyde selon la chimie de Sonogashira (exemple du dérivé de l’adénosine présenté sur la figure (4.5)) [Piton *et al.*, 2007]. L’originalité de leur technique repose sur le fait que le marquage de l’oligonucléotide a été réalisé directement après sa synthèse, sur le support et sans purification préalable. Néanmoins, pour obtenir des rendements quantitatifs, deux substitutions successives sont nécessaires. Au laboratoire, G. Mathis et G. Sicoli ont bi-marqué un oligonucléotide, d’ADN cette fois, sur la position N² d’une guanine [Sicoli *et al.*, 2008]. Pour cela ils ont inséré une 2-fluoro-hypoxanthine au sein de la molécule, puis le groupement fluorure a alors été substitué par un dérivé aminé du radical TEMPO selon la chimie précédemment décrite par Okamoto *et al.* [Okamoto *et al.*, 2004] (nucléotide fonctionnalisé par le nitroxyde TEMPO présenté sur la figure (4.5)). Néanmoins, cette chimie est difficile à mettre en oeuvre et conduit à des rendements faibles.

Nous avons vu qu’il existe différentes stratégies permettant d’introduire les radicaux nitroxydes au sein de la molécule d’ADN. Un paramètre important du marquage utilisé est qu’il doit être suffisamment rigide pour permettre la détermination correcte de la distance entre les deux nitroxydes (distributions de distances fines). De plus, lorsque l’on souhaite comparer des distances pour deux molécules dont la structure globale varie peu, il est important d’utiliser un marquage suffisamment rigide pour permettre de les distinguer. Néanmoins, le marquage employé ne doit pas perturber la structure de la molécule à étudier, ce qui peut être le cas lorsque celui-ci est trop rigide.

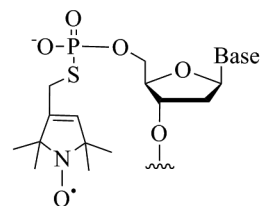
Ainsi, l’introduction du marquage radicalaire sur un phosphate, comme l’ont décrit Grant *et al.*, mène à un système relativement souple, ce qui peut être un inconvénient lors du calcul de la distribution de distances. De même, le marquage au niveau du sucre peut également s’avérer assez souple. Au contraire, le marquage de la base est souvent associé à une plus grande rigidité, à condition que le “linker”, reliant le nitroxyde à la base, soit suffisamment rigide. Il est important, dans ce cas, que le marquage ne gêne pas l’appariement de la base modifiée au sein du duplex d’ADN. Ainsi, l’équipe de S. Sigurdsson a mis au point un dérivé nitroxyde d’une désoxycytidine permettant un marquage rigide sans modification de la structure de la molécule d’ADN (voir composé “Bahrate et al.” sur la figure (4.5)) [Bahrate *et al.*, 2007, Cekan *et al.*, 2008]. Le marquage sur la base utilisé par Piton *et al.*, leur a permis de déterminer des distances entre deux radicaux insérés dans un double brin d’ADN avec des distributions très fines (largeurs de distribution, à mi-hauteur, entre 0,6 Å et 1,4 Å) [Piton *et al.*, 2007]. Au laboratoire, les distributions de distances obtenues, via l’insertion d’un dérivé nitroxyde de la base guanine, sont suffisamment fines pour permettre d’étudier des changements structuraux induits par diverses lésions de l’ADN [Sicoli *et al.*, 2009].



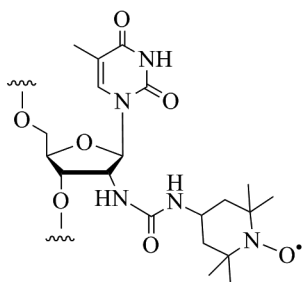
Schieman et al., 2007



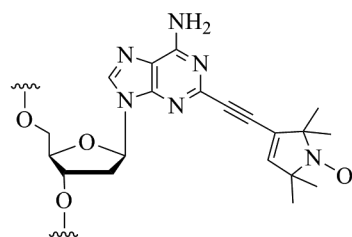
Barhate et al., 2007



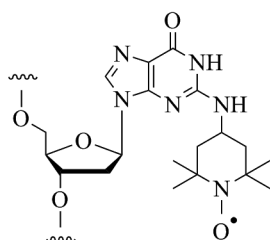
Grant et Qin, 2007



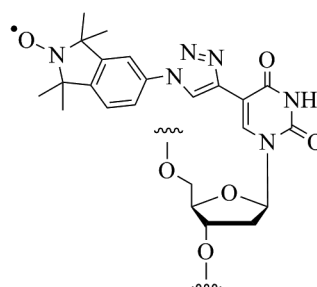
Edwards et al., 2001



Piton et al., 2007



Sicoli et al., 2008
Okamoto et al., 2004



Jakobsen et al., 2010

Figure 4.5 – Exemple de nucléotides modifiés par des nitroxydes pour l'étude de la structure de l'ADN par RPE pulsée

4.2.2 Objectifs de l'étude

Nous venons de le voir, la chimie de marquage des oligonucléotides est une étape clef pour les études par RPE pulsée. Chacune des méthodes, exposées plus haut, présente des avantages et des inconvénients, en terme de facilité de mise en oeuvre de la chimie et de rigidité du système généré.

Au laboratoire, une étude préliminaire avait été menée pour appliquer la chimie click, précédemment décrite dans les chapitres 2 et 3 pour la conception des biopuces, au marquage d'oligonucléotides par des sondes radicalaires TEMPO [Fontecave, 2007]. Cette chimie particulièrement efficace, semble tout à fait pertinente pour ce type de marquage. En effet, elle se réalise dans des conditions douces, compatibles avec la stabilité des nitroxydes, et doit permettre l'obtention de rendements quantitatifs, et est ainsi adaptée à la réalisation de bi-marquage de l'ADN. Très récemment cette approche a d'ailleurs été utilisée par Jakobsen *et al.* pour marquer ("mono-marquage") un oligonucléotide par un radical nitroxyde et étudier, par RPE continue, l'analogue de site abasique THF [Jakobsen *et al.*, 2010].

Nous avons donc poursuivi l'étude préliminaire, menée au laboratoire sur l'utilisation de la chimie click pour l'introduction de radicaux nitroxydes au sein d'oligonucléotides. Dans un premier temps, nous avons comparé deux stratégies de marquage : sur le sucre et sur une des bases de l'ADN. Nous avons ensuite appliqué cette stratégie de marquage pour la préparation de sondes nucléiques paramagnétiques pour l'étude de plusieurs lésions de l'ADN. Nous avons finalement montré le potentiel d'une telle approche pour le multi-marquage et avons construit un double brin d'ADN tri-marqué, ce qui nous a notamment permis de détecter une activité enzymatique de réparation de l'ADN.

Dans cette étude, notre travail a consisté à préparer les échantillons à analyser. Les mesures RPE ont été réalisées par V. Maurel et G. Sicoli de l'équipe de S. Gambarelli du laboratoire de résonance magnétique du CEA-Grenoble (DSM/INAC/SCIB).

4.3 Étude de la stratégie de marquage de l'ADN par chimie click

Nous avons utilisé la chimie click pour introduire des radicaux nitroxydes TEMPO au sein d'oligonucléotides que nous voulons étudier par RPE. Au laboratoire, l'azido-TEMPO avait été synthétisé préalablement. Ainsi, pour réaliser le marquage de l'ADN, avec cette molécule nous avons introduit une fonction alcyne dans la séquence d'ADN. Nous avons utilisé pour cela deux synthons phosphoramidites commerciaux, l'un portant le groupement alcyne sur le sucre (2'-O-propargyl uridine), utilisé précédemment pour le greffage sur support des oligonucléotides, et un second portant ce groupement sur la base (5-éthynyle-désoxyuridine) (figure (4.6)). Nous avons donc, dans un premier temps, comparé ces deux sites de marquage pour la mesure de distance entre deux nitroxydes TEMPO insérés dans un oligonucléotide en duplex, par RPE pulsée.

Oligonucléotide	Séquence 5'→3'
Bi-marqué	G <i>UA</i> AGG TCC AGA GA <i>U</i> G
Complémentaire non-marqué	CAT CTC TGG ACC TTA G

Tableau 4.1 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour comparer les stratégies de marquage (U est le nucléotide modifié portant la fonction alcyne sur le sucre ou sur la base).

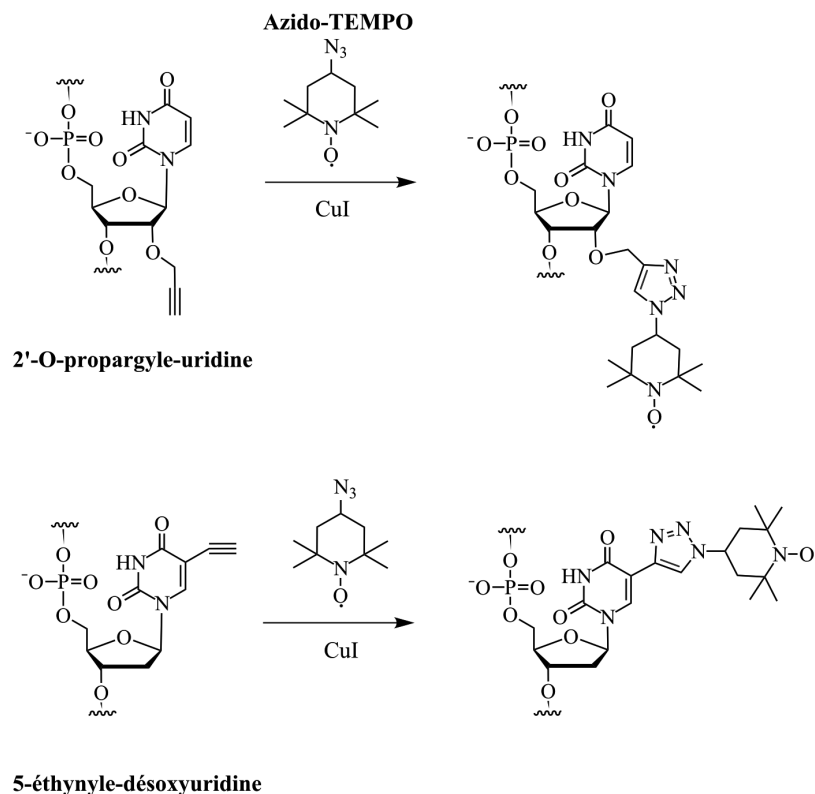


Figure 4.6 – Formules chimiques des nucléotides modifiés portant la fonction alcyne et réactions de chimie click avec l'azido-TEMPO.

4.3.1 Marquage radicalaire par chimie click

Les deux nucléotides alcynes ont été incorporés, par synthèse chimique sur support, au sein d'un oligonucléotide de séquence définie dans le tableau (4.1). Les oligonucléotides ainsi synthétisés sont nommés di-propargyle et di-éthynyle en fonction du nucléotide alcyne utilisé. Nous avons choisi d'insérer les deux nitroxydes sur le même brin ce qui nous permettra de faire une unique synthèse et de pouvoir étudier facilement les changements structuraux induits par différentes modifications portées par le brin complémentaire.

Une fois les oligonucléotides synthétisés et purifiés par r-HPLC, ils ont été analysés par chromatographie r-HPLC et spectrométrie de masse. Nous avons ensuite procédé au bi-marquage, par le nitroxyde TEMPO, du brin contenant les fonctions alcynes. Pour cela, nous avons fait réagir, en solution, les oligonucléotides contenant la fonction alcyne, avec un excès d'azido-TEMPO en présence de cuivre(I). Après une nuit de réaction, les mélanges bruts de synthèse ont été analysés par r-HPLC (figures (4.7) et (4.8)).

Les figures (4.7) et (4.8) présentent les chromatogrammes HPLC des brins bi-alcyne avant (a),

et après réaction de chimie click (b). Il apparaît clairement sur les chromatogrammes obtenus que les réactions de chimie click sont quantitatives, avec une disparition totale du produit de départ

Sur le chromatogramme du brin bi-propargyle (figure (4.7a)), le produit est élué à 21,9 minutes dans ces conditions. Le chromatogramme du brut de réaction de chimie click sur cet oligonucléotide (figure (4.7b)), montre la présence d'un produit majoritaire élué à 30,6 minutes. De même pour le brin bi-éthynyle, le produit bi-alcyne est élué à 19,7 minutes (figure (4.8a)), et le chromatogramme du brut de réaction (figure (4.8b)) indique la formation d'un produit majoritaire élué à 31,1 minutes. Pour ces deux marquages nous constatons donc qu'il n'y a plus de produit de départ, ce qui indique que dans ces conditions, les réactions sont complètes pour les deux oligonucléotides. Nous avons ainsi obtenu de très bons rendements, de l'ordre de 82 % pour le bi-propargyle et de 74 % pour le bi-éthynyle.

Les bruts de synthèse ont été purifiés par r-HPLC et les oligonucléotides bi-marqués résultants, appelés bi-propargyle-TEMPO et bi-éthynyle-TEMPO ont alors été caractérisés par spectrométrie de masse, afin de s'assurer de l'intégrité des fragments nucléiques et de la bonne incorporation des deux marqueurs radicalaires (figure (4.9)).

4.3.2 Mesures des températures de fusion des duplex bi-marqués

Les brins bi-marqués ont alors été hybridés avec leur complémentaire non-marqué dont la séquence est indiquée dans le tableau (4.1). Le double-brin ainsi formé est noté "(2-15)", les marqueurs étant positionnés sur les nucléosides 2 et 15 de la séquence (figure (4.10)). Afin d'éviter de générer un signal parasite, lors de la détermination des distances par RPE pulsée, nous mettons toujours le brin complémentaire non marqué en excès. En effet, si une partie du brin bi-marqué se retrouve sous forme simple-brin, cela pourrait générer des distances parasites du fait de la proximité des deux nitroxydes.

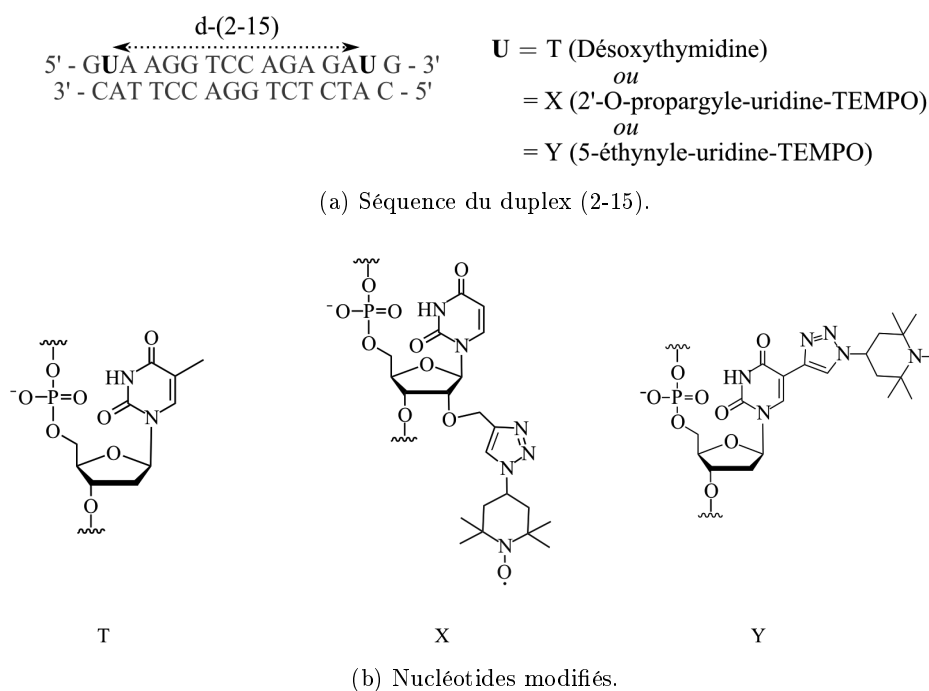


Figure 4.10 – Séquence du double brin (2-15) étudié et modifications insérées.

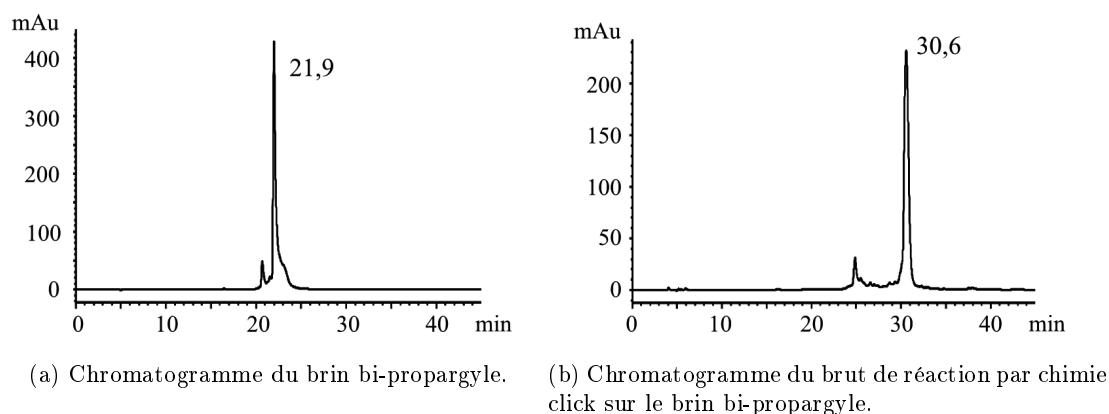


Figure 4.7 – Chromatogrammes HPLC (gradient 3-15 % acétonitrile/TEAA 10 mM, 42 minutes, colonne C18) du brin 16m bi-propargyle, avant (a) et après réaction de chimie click (b).

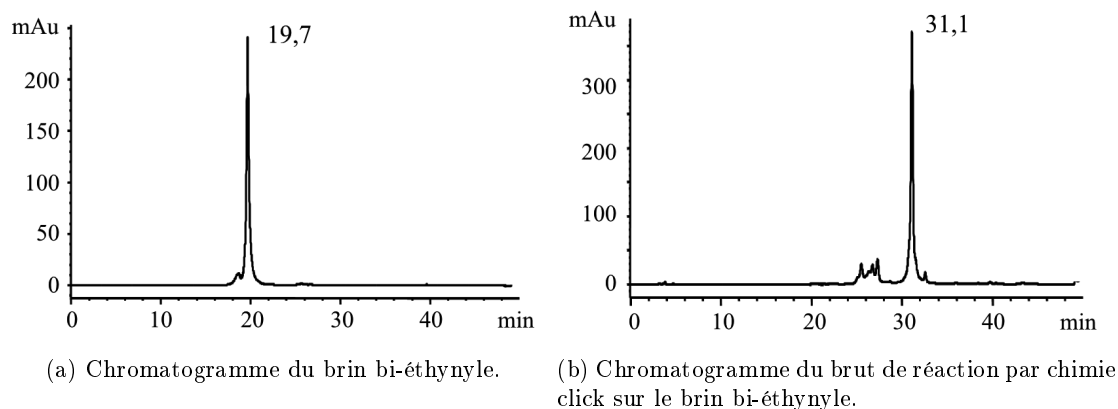


Figure 4.8 – Chromatogrammes HPLC (gradient 4-16 % acétonitrile/TEAA 10 mM, 42 minutes, colonne C18) du brin 16m bi-éthynyle, avant (a) et après réaction de chimie click (b).

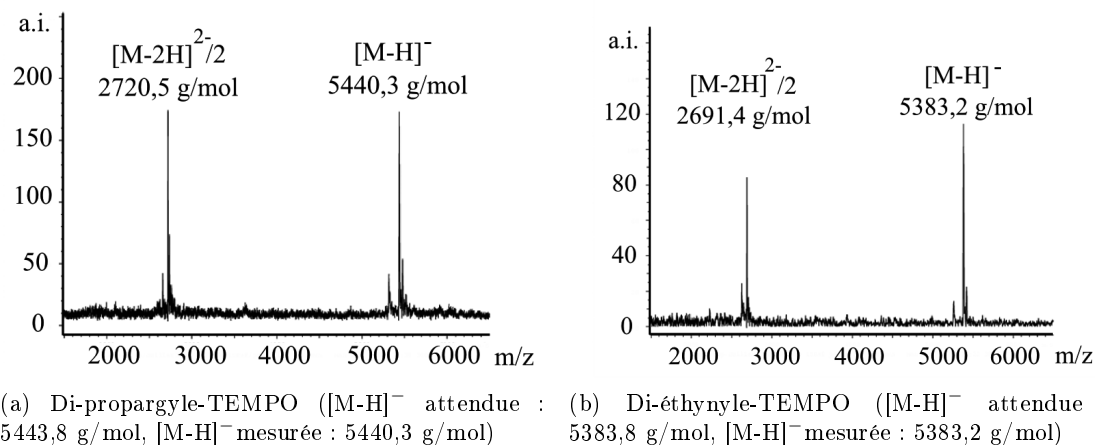


Figure 4.9 – Spectres de masse MALDI-TOF (mode négatif) des oligonucléotides bi-marqués.

duplex	Séquence du brin sonde 5'→3'	T _m (°C)
(2-15)-Ref	GTA AGG TCC AGA GAT G	60,7 ± 0,3
(2-15)-2'-TEMPO	GXA AGG TCC AGA GAX G	56,7 ± 0,5
(2-15)-5-TEMPO	GYA AGG TCC AGA GAY G	59,2 ± 1,3

Tableau 4.2 – Mesures des températures de fusion des duplex sans marquage ((2-15)-REF) ou bi-marqués, sur la position 2' du sucre ((2-15)-2'-TEMPO) et sur la position 5 de la base uracile ((2-15)-5-TEMPO).

Nous avons vérifié, par la mesure des températures de fusion (T_m), que l'incorporation de ces marqueurs radicalaires ne gênait pas la bonne formation du duplex. Afin de comparer ces températures de fusion, nous avons également synthétisé un oligonucléotide de même séquence que celle des oligonucléotides bi-marqués, mais en remplaçant le nucléotide alcyne par le nucléotide normal correspondant, c'est à dire la désoxythymidine (figure (4.10)).

Comme l'indique le tableau (4.2), la température de fusion de double brin non modifié, (2-15) est de 60,7 °C. Celle du duplex marqué sur le sucre, (2-15)-2'-TEMPO, est de 56,7 °C et celle du duplex marqué sur la base, (2-15)-5-éthynyle, est de 59,2 °C.

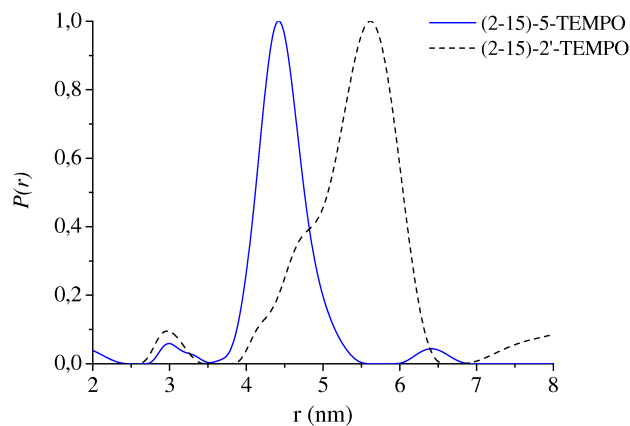
Il apparaît donc que l'insertion des nitroxydes sur ces positions de l'ADN modifie peu la température de fusion, ce qui indique que l'insertion des marqueurs déstabilise peu le double brin. Ceci est conforme à ce que l'on pouvait attendre puisque le sucre ne participe pas aux liaisons hydrogènes assurant la structure en double brin de l'ADN. La position 5 de la base uracile, quant à elle, ne participe pas à l'appariement avec la base adénine complémentaire. Ces observations sont en accord avec des résultats précédemment établis pour différents marquages réalisés sur la position 5 de la base uracile et en position 2 de la guanine [Sicoli *et al.*, 2008, Jakobsen *et al.*, 2010].

4.3.3 Mesures des distances par RPE pulsée

Nous avons ensuite mesuré, par RPE pulsée, les distances entre les deux radicaux pour les deux duplex bi-marqués. Nous avons ainsi établi les paramètres caractéristiques des deux distributions : la distance, notée d-(2-15), ainsi que la largeur à mi-hauteur de la distribution, notée *W*.

La figure (4.11a) représente les distributions de distances obtenues pour les deux duplex. Les valeurs de la distance mesurée ainsi que la largeur des distributions sont indiquées dans la tableau (4.11b). La distribution obtenue pour le duplex (2-15)-2'-TEMPO est plus large et dissymétrique que celle obtenue pour le duplex (2-15)-5-TEMPO. La distance maximale mesurée pour le duplex marqué sur le sucre ((2-15)-2'-TEMPO) est plus grande (5,65 nm) que celle déterminée pour le duplex marqué sur la base (2-15)-5-TEMPO (4,40 nm). Pour les deux duplex, bien que nous obtenions une distance majoritaire nous remarquons également la présence de plusieurs distances minoritaires. Ces pics secondaires ne correspondent pas à des distances "réelles", mais sont dus à des artéfacts du traitement mathématique. C'est pourquoi, les distances qui seront discutées par la suite correspondront aux distances majoritaires.

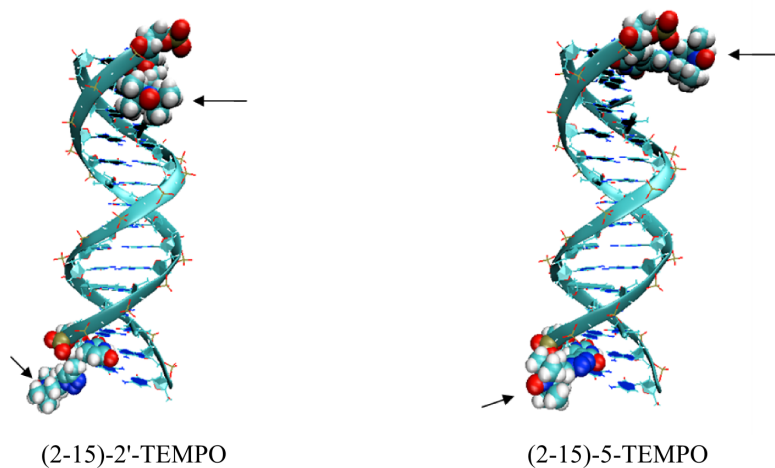
La principale distance inter-spin mesurée pour le marquage sur le sucre (duplex (2-15)-2'-TEMPO) est plus longue que celle déterminée pour le marquage sur la base



(a) Distributions de distances.

Duplex	d-(2-15) (nm)	W(nm)	d-(2-15) obtenues par modélisation (nm)
(2-15)-2'-TEMPO	5,65	1,0	$4,98 \pm 0,49$
(2-15)-5-TEMPO	4,40	0,6	$4,38 \pm 0,23$

(b) Distances et largeurs des distributions mesurées expérimentalement (arrondies à 0,05 nm près) et distances calculées par modélisation de dynamique moléculaire.



(c) Modélisations de dynamique moléculaire obtenues pour les deux duplex non-lésés, où les flèches indiquent la position des nitroxydes.

Figure 4.11 – Distributions de distances entre les deux nitroxydes pour les duplex (2-15)-2'-TEMPO (marquage en position 2' du sucre) et (2-15)-5-TEMPO (marquage position 5 de la base) obtenues après régularisation de Tikhonov et comparaison avec les résultats de modélisation.

(duplex (2-15)-5-TEMPO) bien que les nucléotides marqués soient à la même position dans la séquence oligonucléotidique. Ceci s’explique par le fait que les radicaux ne sont pas introduits sur la même position du nucléotide (sucre et base), et qu’ainsi l’orientation des nitroxydes dans l’espace est différente (figure (4.11c)). Des modélisations de dynamique moléculaire ont été réalisées par l’équipe de Y. Boulard du laboratoire de biologie intégrative du CEA-Saclay (DSV/IBITEC/SBIGM) et ont donné les résultats présentés sur la figure (4.11c) dont les valeurs de distances indiquées dans le tableau (4.11b). Nous obtenons ainsi une bonne corrélation avec les résultats expérimentaux obtenus pour le marquage sur la base. Les résultats de modélisation pour le marquage sur le sucre sont néanmoins plus éloignés. La distribution de distances mesurée pour ce marquage est assez large ce qui peut expliquer cette différence. Malgré cela nous constatons la même tendance entre les résultats obtenus par mesure RPE et les modélisations, à savoir, une distance plus courte pour le marquage sur la base par rapport au marquage sur le sucre.

Le marquage sur la base permet d’obtenir une distribution beaucoup plus fine que le marquage sur le sucre. Ceci est dû à la rigidité du système. D’une part le marquage sur une base apporte plus de rigidité du fait de l’appariement de celle-ci au sein du double-brin. D’autre part, le “linker” reliant le nitroxyde au nucléotide est plus long dans le cas du marquage sur le sucre (3 carbones) que dans le cas de la base (2 carbones), ce qui a pour effet d’augmenter encore la souplesse du système. Notons également que la distribution du duplex (2-15)-2’-TEMPO est légèrement dissymétrique. Il est possible que cette dissymétrie soit due à la présence d’une population minoritaire de duplex dans une conformation différente.

Enfin, la largeur de la distribution de distances déterminée pour le duplex (2-15)-5-TEMPO, bien que plus faible que celle du duplex (2-15)-2’-TEMPO, reste supérieure à ce qui avait été préalablement obtenu par le marquage de la position 2 de la base guanine [Sicoli *et al.*, 2008]. Néanmoins, il semble que la distribution de distances obtenue ici soit suffisamment fine pour permettre l’étude de changements structuraux induits par des dommages de l’ADN. De plus, la chimie click développée ici est très simple à mettre en oeuvre et conduit à des rendements élevés. Cette approche permet donc de réaliser des marquages multiples sur des quantités importantes d’oligonucléotides.

4.4 Application à la détection de déformations induites par des lésions de l'ADN

Nous avons appliqué cette stratégie de marquage par chimie click à l'analyse de déformations structurales induites par des lésions de l'ADN.

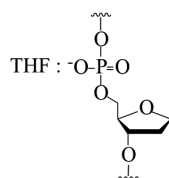
4.4.1 Mesure du changement structural induit par l'analogue de site abasique THF

Nous avons ainsi choisi d'étudier, dans un premier temps, un analogue de site abasique, qui avait déjà fait l'objet d'une précédente étude, au laboratoire, utilisant un marquage par un nitroxyde sur la guanine [Sicoli *et al.*, 2009].

Nous avons pour cela synthétisé un oligonucléotide, complémentaire aux brins bi-marqués, contenant l'analogue de site abasique tétrahydrofurane (THF) (figure (4.12)). Cette modification a été insérée à la place d'une guanine, en position centrale de la séquence.

Brin	Séquence 5'→3'
bi-marqué 2'-TEMPO	G X A AGG TCC AGA G X G
bi-marqué 5'-TEMPO	G Y A AGG TCC AGA G Y G
non-lésé	CAT CTC TGG ACC TTA C
THF	CAT CTC T(THF)G ACC TTA C

(a) Séquences des oligonucléotides.

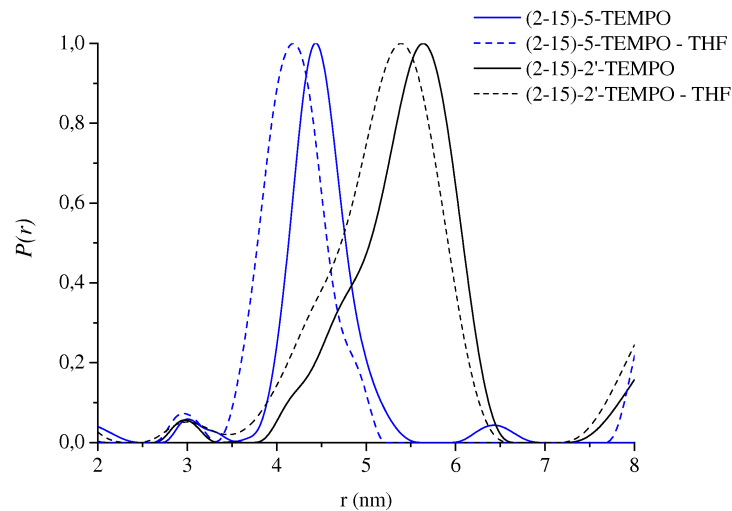


(b) Structure du nucléotide THF.

Figure 4.12 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour cette étude, où X représente le nucléotide 2'-O-propargyle-TEMPO et Y le 5-éthynyle-TEMPO.

L'étude concernant le résidu THF a été réalisée pour les deux sites de marquage (sucre et base), afin de comparer leurs performances respectives pour ce type d'étude. Nous avons hybridé les brins bi-marqués avec le brin complémentaire contenant le THF. Nous avons alors étudié l'effet de la présence du THF sur les distributions de distances obtenues par RPE pulsée pour les deux types de marquage (figure (4.13)).

La figure (4.13a) présente les distributions de distances mesurées pour les quatre duplex : (2-15)-5-TEMPO, (2-15)-5-TEMPO-THF, (2-15)-2'-TEMPO et (2-15)-2'-TEMPO-THF. Les paramètres des distributions sont indiqués dans la tableau (4.13b). Ainsi, nous mesurons une distance majoritaire de 5,40 nm pour le duplex (2-15)-2'-TEMPO-THF et de 4,20 nm pour le duplex (2-15)-5'-TEMPO-THF. Pour les deux marquages, l'insertion du THF dans la séquence de l'oligonucléotide diminue cette distance de 0,25 nm par rapport aux duplex non-modifiés.



(a) Distributions de distances.

Duplex	d-(2-15) (nm)	W(nm)	Δd (nm)
(2-15)-2'-TEMPO	5,65	1,0	
(2-15)-2'-TEMPO - THF	5,40	1,2	-0,25
(2-15)-5-TEMPO	4,40	0,6	
(2-15)-5-TEMPO - THF	4,20	0,8	-0,25

(b) Distances mesurées expérimentalement et largeurs des distributions (arrondies à 0,05 nm près).

Figure 4.13 – Distributions de distances entre les deux nitroxydes pour les duplex (2-15)-TEMPO - THF, pour le marquage en position 2' du sucre et en position 5 de la base, obtenues par RPE pulsée après régularisation de Tikhonov.

L'incorporation du THF a également pour effet d'augmenter la largeur des distributions (W). Ainsi, pour le marquage sur le sucre (série (2-15)-2'-TEMPO), la largeur passe de 1,0 nm pour le duplex non-lésé à 1,2 nm pour le duplex contenant le THF. De même pour le marquage sur la base (série (2-15)-5-TEMPO), cette largeur passe de 0,6 nm à 0,8 nm.

Ainsi le remplacement d'une base guanine, en position centrale de la séquence, par l'analogue de site abasique THF, augmente la largeur de la distribution de distances. Ceci s'explique par le fait que la présence de ce résidu diminue la rigidité du système, puisqu'il ne permet pas de former des liaisons hydrogènes avec la base lui faisant face au sein du double brin. Ce résultat est en accord avec les résultats précédemment décrits par Sicoli *et al.* [Sicoli *et al.*, 2009].

Nous avons également constaté que, pour les deux types de marquage, la distance entre les deux nitroxydes diminue avec l'insertion du THF. Il est connu que la présence d'un site abasique dans un duplex d'oligonucléotides ne perturbe pas la forme globale de la molécule, qui reste dans une configuration d'ADN-B [Takeshita *et al.*, 1987, Ayadi *et al.*, 1999]. Néanmoins, cela a un impact sur la déformation locale du duplex au niveau du site abasique, qui dépend de la base à laquelle celui-ci est apparié et également des bases qui l'entourent. Il a ainsi été montré que, lorsqu'un site abasique fait face à une cytosine, les deux résidus ont tendance à

être extra-hélicaux [Cuniasse *et al.*, 1990, Sicoli *et al.*, 2009]. Sicoli *et al.* ont ainsi mesuré expérimentalement, par une analyse par RPE pulsée, une variation de distance de -0,35 nm entre la structure contenant le THF apparié à une cytosine et la structure contenant l'appariement normal (G : C) [Sicoli *et al.*, 2009]. Il semble également que les variations structurales dépendent de la concentration en ions présents dans la solution. Le Mg^{2+} a notamment un effet “compresseur” de la double hélice, ce qui a pour conséquence de diminuer le stacking¹ de la base opposée au site abasique [Stivers, 1998, Pompizi *et al.*, 2000]. Dans notre cas, le THF est apparié à une cytosine et la manipulation a été réalisée en présence de Mg^{2+} . La diminution de la distance que l'on observe semble donc associée aux effets que nous venons de citer, c'est-à-dire à une modification du stacking des bases entourant le THF et au fait que le THF ainsi que la cytosine qui lui fait face se placent en position extra-hélicale.

4.4.2 Mesure du changement structural induit par des adduits platinés

4.4.2.1 Intérêts de l'étude des adduits platinés

Nous nous sommes ensuite intéressés à une famille d'adduits à l'ADN formés par les agents chimiothérapeutiques platinés cisplatine et oxaliplatine. Ces deux composés sont connus pour cibler l'ADN en formant des pontages intra- et inter-brin (voir Chapitre 1, paragraphe “Les pontages ADN-ADN” page 14). Le site privilégié d'attaque de ces molécules est la position N⁷ des purines. Les adduits majoritairement formés par ces deux molécules sur l'ADN sont les pontages intra-brin entre deux guanines adjacentes (intra-1,2-GpG, figure (4.14)) et entre une adénine et une guanine (intra-1,2-ApG). Bien que ces adduits soient majoritairement réparés par la voie de la NER, ils peuvent donner lieu au mécanisme de synthèse translésionnelle et sont également reconnus par les protéines de la voie du MMR. De plus, ces adduits peuvent être reconnus par la protéine HMGB1, qui reconnaît les torsions de l'ADN et est notamment impliquée dans l'inhibition de la synthèse translésionnelle et la réparation de ces adduits par la NER [Chaney *et al.*, 2005].

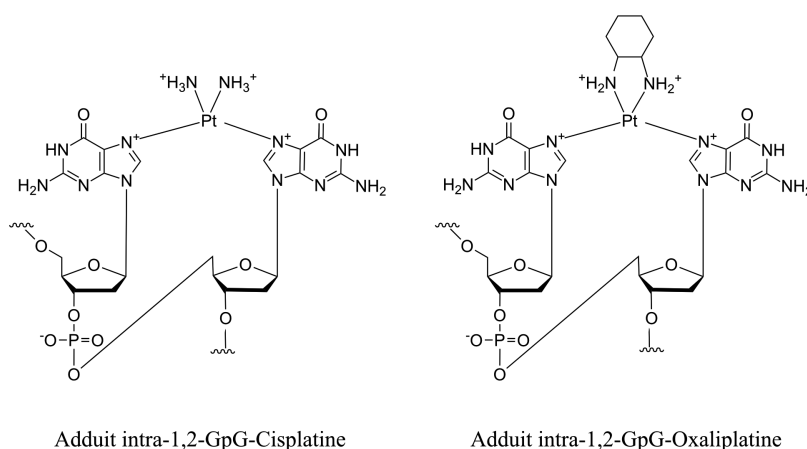


Figure 4.14 – Adduits majoritaires formés par le cisplatine et l'oxaliplatine entre deux guanines adjacentes : intra-1,2-GpG.

¹Le stacking correspond aux interactions des orbitales π entre deux groupements aromatiques, tels que les bases de l'ADN.

Les adduits intra-1,2-GpG formés par l’oxaliplatine et le cisplatine, bien que similaires, sont reconnus différemment par certaines protéines, notamment par celles impliquées dans les systèmes de réparation. Les protéines de la voie de la NER ne discriminent pas les deux types d’adduits contrairement aux protéines du MMR [Chaney *et al.*, 2005]. Les protéines du MMR semblent, par exemple, posséder une meilleure affinité pour l’adduit intra-1,2-GpG du cisplatine que celui de l’oxaliplatine. L’efficacité de ces molécules est principalement attribuée au MMR qui, lorsque l’adduit est présent, induit des cycles futiles d’excision des nucléotides complémentaires sans réparation de l’adduit lui-même ce qui finit par provoquer la mort cellulaire. L’efficacité de l’oxaliplatine pour le traitement des cellules résistantes au cisplatine semble être attribuée à la différence de reconnaissance par le MMR [Chaney *et al.*, 2005]. De plus, il a été montré qu’une déficience en MMR augmente la résistance au cisplatine alors que cela n’a pas d’effet pour un traitement à l’oxaliplatine.

Ces différences de reconnaissance semblent provenir de la structure même des adduits formés par ces deux composés. Ainsi de nombreux travaux sont menés sur l’étude structurale de ces adduits et, en particulier, celui de l’adduit majoritaire intra-1,2-GpG. Cet adduit conduit à une modification significative de la molécule d’ADN par rapport à la structure initiale [Ramachandran *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2007]. Les travaux décrits dans la littérature pour l’adduit formé par le cisplatine rapportent des valeurs d’angle de torsion très différents allant de 22° à 80° selon les auteurs, les séquences et les méthodes utilisées [Dunham *et al.*, 1998, Kartalou et Essigmann, 2001, Ramachandran *et al.*, 2009]. L’ensemble des études menées sur l’oxaliplatine s’accordent pour attribuer une torsion induite par l’adduit intra-1,2-GpG de l’ordre de 30° [Ramachandran *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2007, Spingler *et al.*, 2001]. Ces mesures dépendent cependant de la séquence et de la méthode utilisées. Il apparaît néanmoins que les structures globales des duplex d’ADN contenant ces deux adduits sont similaires mais que des modifications structurales sont observées au niveau de l’adduit [Ramachandran *et al.*, 2009, Wu *et al.*, 2007].

Les nombreuses études menées sur l’adduit intra-1,2-GpG pour le cisplatine et l’oxaliplatine ont utilisé des techniques classiques de RMN, de diffraction des rayons X ou encore de mesure de mobilité sur gel d’électrophorèse. Nous avons donc voulu appliquer la méthode de RPE pulsée pour mesurer la déformation induite par l’adduit intra-1,2-GpG du cisplatine et de l’oxaliplatine.

4.4.2.2 Préparation des oligonucléotides platinés

Pour étudier l’adduit intra-1,2-GpG, nous avons utilisé l’oligonucléotide “non-lésé” présenté précédemment, contenant un seul site “GG” (deux guanines adjacentes) dont la séquence est rappelée dans le tableau (4.3). Cette séquence avait préalablement été utilisée par Ohndorf *et al.* et He *et al.* pour l’étude de la reconnaissance de l’adduit intra-1,2-GpG-cisplatine par la protéine HMGB1 [Ohndorf *et al.*, 1999, He *et al.*, 2000].

Nous l’avons décrit précédemment, l’adduit majoritairement formé au sein d’un fragment d’ADN traité à ces dérivés platinés, est l’intra-1,2-GpG bien qu’il puisse aussi se former l’adduit intra-1,2-ApG (25 %). La séquence que nous avons choisie présente un site “GA”, ce qui pourrait, *a priori*, gêner la purification du produit contenant uniquement l’adduit intra-1,2-GpG. Néanmoins, la formation de l’adduit intra-1,2-GpA, contrairement à l’adduit intra-1,2-ApG, est très faible si bien que la présence de ce site ne constitue pas un problème pour la purification du produit que

Brin	Séquence 5'→3'
Non-lésé	CAT CTC TGG ACC TTA C
Bi-marqué	G <i>U</i> A AGG TCC AGA GA <i>U</i> G

Tableau 4.3 – Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'étude des adduits platinés, où U représente le nucléotide marqué par le nitroxyde TEMPO sur la base ou sur le sucre.

l'on souhaite étudier [Hambley *et al.*, 1998].

Afin d'obtenir l'oligonucléotide contenant l'adduit intra-1,2-GpG, nous avons fait réagir, pendant une nuit à 37 °C, l'oligonucléotide non-lésé avec du cisplatine et de l'oxaliplatine. Les mélanges bruts de réaction ont alors été purifiés par r-HPLC et les produits obtenus ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (figure (4.15)).

Afin de s'assurer de la présence de l'adduit et de vérifier qu'il s'est bien formé entre deux guanines adjacentes, nous avons digéré une partie des oligonucléotides lésés avec le cisplatine et l'oxaliplatine par des exonucléases. Pour cela, nous avons utilisé d'une part une exonucléase 3'→5' et d'autre part une exonucléase 5'→3'. Des prélèvements ont été réalisés à différents temps et ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette méthode nous permet de confirmer la séquence de l'oligonucléotide et ainsi de vérifier la présence du pontage intra-1,2-GpG désiré.

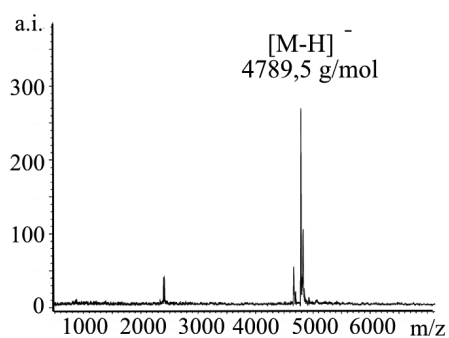
La figure (4.16) montre les spectres de masse obtenus à différents temps pour les digestions de l'oligonucléotide lésé au cisplatine, par les deux exonucléases (les séquences correspondant aux produits détectés par cette technique sont indiquées sur cette figure). La figure (4.17) présente les résultats obtenus après deux heures de digestion du brin lésé à l'oxaliplatine par les deux exonucléases. Ainsi après deux heures de digestion 3'→5', nous obtenons un produit de masse 2917,3 g/mol pour le brin "cisplatine", et de 2997,6 g/mol pour le brin "oxaliplatine". Après deux heures de digestion 5'→3', un seul produit de masse 3265,9 g/mol pour le brin "cisplatine", et de masse 3308 g/mol pour le brin "oxaliplatine" est détecté.

L'identification des produits obtenus pour ces digestions nous permet de constater que la digestion 3'→5' est bloquée au niveau du site "GG". Le nucléotide dA en 3' de ce site est bien digéré, ce qui confirme que l'adduit n'est pas formé entre une guanine et cette adénine. La digestion 5'→3', quant à elle, s'arrête à un nucléotide avant le site "GG", aussi bien pour l'adduit cisplatine que l'adduit oxaliplatine. Au bout de deux heures de digestion par l'exonucléase 5'→3, il reste un phosphate pour le brin "cisplatine", ce qui n'est pas le cas pour le brin "oxaliplatine". Il est probable qu'en poursuivant la réaction plus longtemps ce phosphate terminal aurait été hydrolysé.

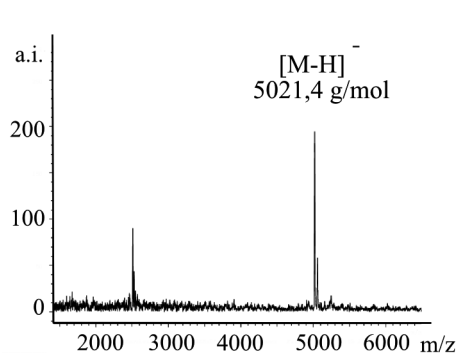
Nous avons ainsi montré que l'adduit intra-1,2-GpG était bien présent dans les deux brins lésés (cisplatine et oxaliplatine) et avons constaté qu'il est bloquant pour les deux exonucléases dans les conditions utilisées.

4.4.2.3 Détermination des distances par RPE pulsée

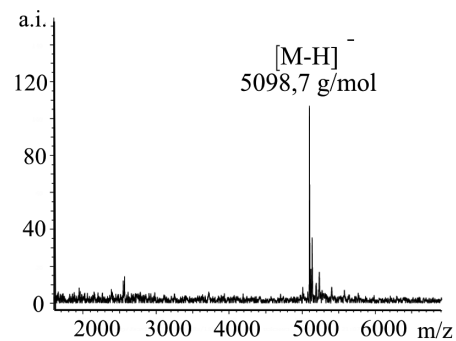
Une fois les oligonucléotides comportant les adduits platinés purifiés et caractérisés, ceux-ci ont été hybridés avec le brin complémentaire bi-marqué, sur la base et sur le sucre, suivant le protocole précédemment établi. La détermination des distances inter-spin (entre les deux nitroxydes)



(a) Brin non-lésé ($[M-H]^-$ attendue : 4791,2 g/mol, $[M-H]^-$ mesurée : 4789,5 g/mol).



(b) Brin "cisplatine" ($[M-H]^-$ attendue : 5022,2 g/mol, $[M-H]^-$ mesurée : 5021,4 g/mol).



(c) Brin oxaliplatine ($[M-H]^-$ attendue : 5100,5 g/mol, $[M-H]^-$ mesurée : 5098,7 g/mol).

Figure 4.15 – Spectre de masse MALDI-TOF (mode négatif) des brins "non-lésé" (a), "cisplatine" (b) et "oxaliplatine" (c).

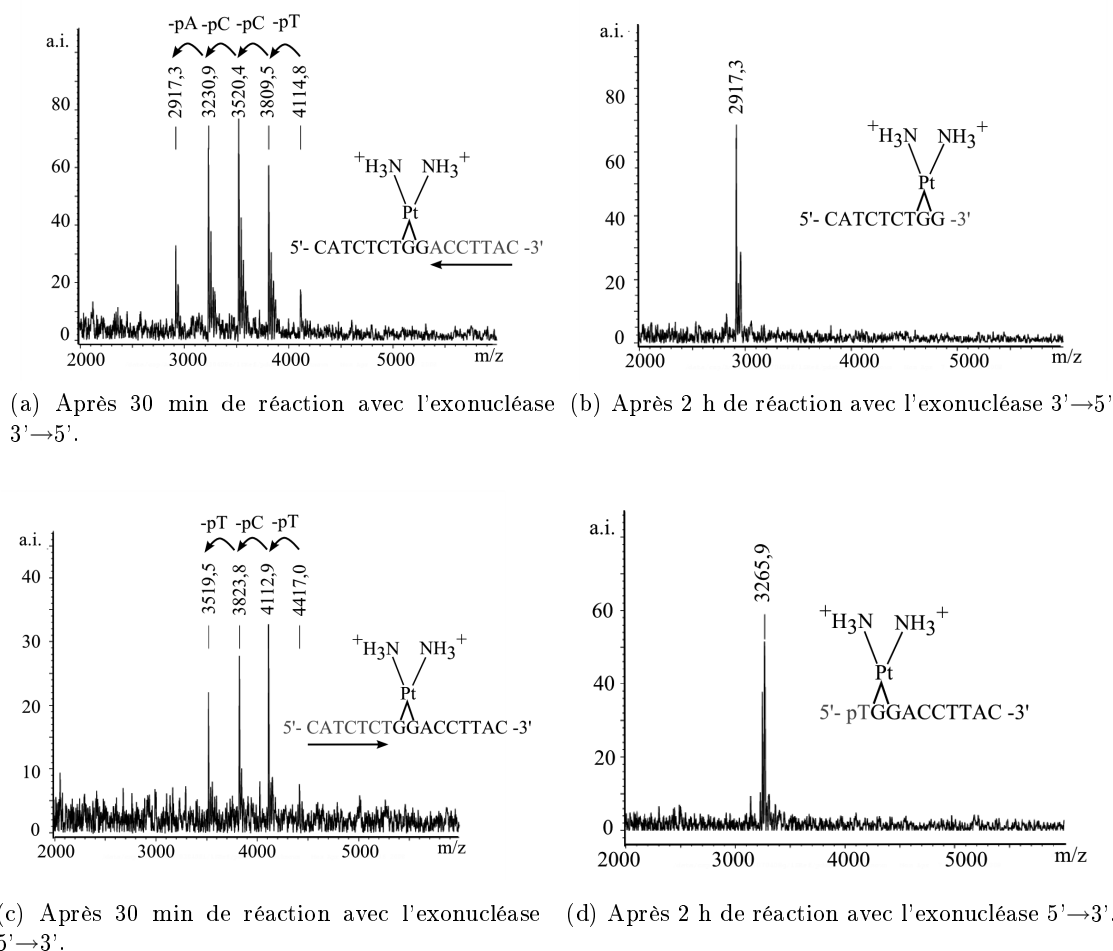


Figure 4.16 – Spectres de masse MALDI-TOF obtenus au cours des réactions de digestion du brin “cisplatine” par les exonucléases (3'→5' : (a) et (b), 5'→3' : (c) et (d)), pT signifie désoxythymidine.

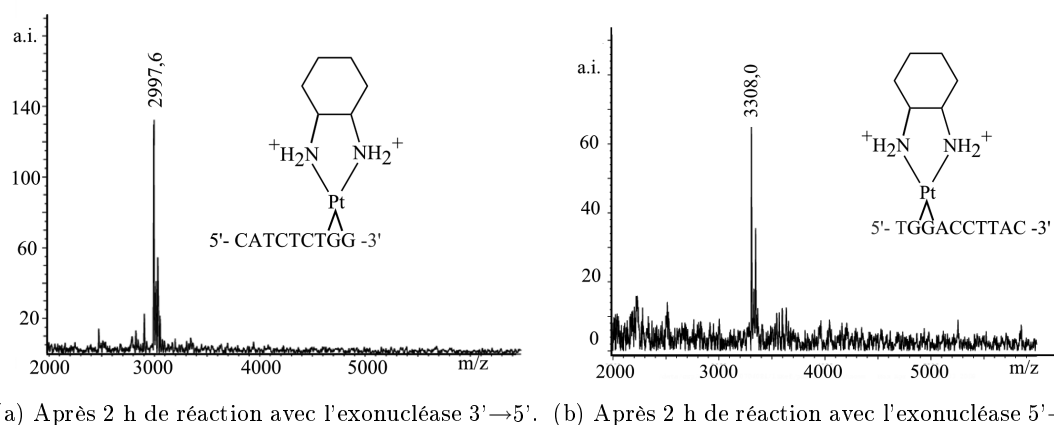


Figure 4.17 – Spectres de masse MALDI-TOF obtenus au cours des réactions de digestion du brin “oxaliplatine” par les exonucléases (3'→5' : (a), 5'→3' : (b)).

a alors été réalisée par RPE pulsée.

La figure (4.18) indique les distributions obtenues avec le marquage sur le sucre pour les duplex Non-lésé, Cisplatine et Oxaliplatine. Les distributions de distances pour les deux duplex lésés sont très larges si bien qu'il est difficile d'interpréter ces résultats. Il apparaît cependant que la présence des adduits platinés ait tendance à diminuer la distance entre les deux nitroxydes par rapport au duplex non-lésé.

La figure (4.19a) représente les distributions de distances obtenues pour les double brins non lésé, cisplatine et oxaliplatine, pour le marquage sur la base. Les valeurs caractéristiques de ces distributions sont données dans le tableau (4.19b). Nous constatons que les distances principales déterminées pour les deux duplex lésés sont plus élevées que celle obtenue pour le duplex non-lésé (4,90 nm pour le double brin cisplatine, 5 nm pour le double brin oxaliplatine, et 4,40 nm pour le non-lésé), les largeurs des distributions restant identiques pour les trois duplex (0,6 nm).

Contrairement au marquage sur le sucre, les résultats obtenus pour le marquage sur la base montrent des distributions relativement fines. Les distances entre les deux sondes nitroxydes mesurées pour les duplex lésés sont significativement différentes par rapport au non-lésé (figure (4.19b)). Nous observons ainsi une augmentation de cette distance de 0,5 nm pour le cisplatine et de 0,55 nm pour l'oxaliplatine. Ceci confirme que la présence de l'adduit intra-1,2-GpG platiné modifie la structure de la molécule d'ADN. Cette tendance semble *a priori* être en contradiction avec celle obtenue pour le marquage sur le sucre, pour lequel une diminution de distances est observée. Néanmoins, pour ces duplex, les nitroxydes sont placés à des positions différentes sur le nucléotide si bien qu'il est important de tenir compte de la structure 3D de la molécule afin d'interpréter ces variations de distances. Des essais de modélisations de ce système ont été réalisés par l'équipe de Y. Boulard mais n'ont pas permis d'apporter une réponse claire sur ces résultats. Cette étude théorique est relativement compliquée car elle nécessite la modélisation de nombreuses liaisons moléculaires de natures diverses. Les données des constantes de raideur des liaisons impliquées dans les quatre bases de l'ADN sont maintenant assez bien connues, néanmoins, celles des liaisons du nitroxyde, et encore plus celles des adduits platinés, sont moins connues. Aussi la modélisation de ces duplex est très compliquée et nécessiterait des études complémentaires afin d'affiner les constantes utilisées.

Les résultats obtenus par RPE pulsée, pour le marquage sur la base, ne permettent pas de distinguer les deux duplex "Cisplatine" et "Oxaliplatine", ce qui va dans le sens d'une déformation globale identique. Des résultats de modélisations de dynamiques moléculaires réalisées par Ramachandran *et al.* sur un duplex de 12 nucléotides de long, possédant l'adduit intra-1,2-GpG avec le cisplatine et l'oxaliplatine dans un contexte de séquence identique au nôtre (TGGA), montrent une importante différence de structure globale entre le duplex non-lésé et les duplex lésés [Ramachandran *et al.*, 2009]. Ils n'avaient néanmoins pas déterminé de différence importante sur la structure globale du duplex entre celui lésé au cisplatine et celui lésé à l'oxaliplatine (figure (4.20)). Les résultats de RPE pulsée que nous avons obtenus dans ce même contexte de séquence semblent donc aller dans le sens de ces travaux.

Cette étude nous a permis de constater que le marquage sur le sucre n'était pas adapté à l'analyse des dommages induisant une diminution de la rigidité du duplex. En effet, celui-ci a

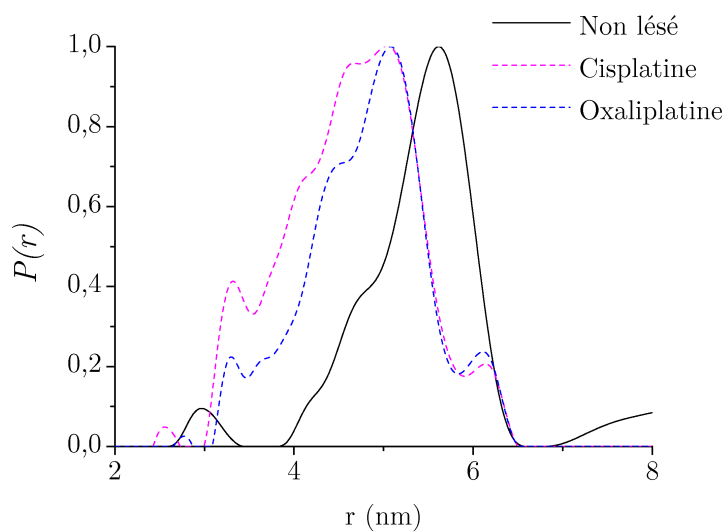
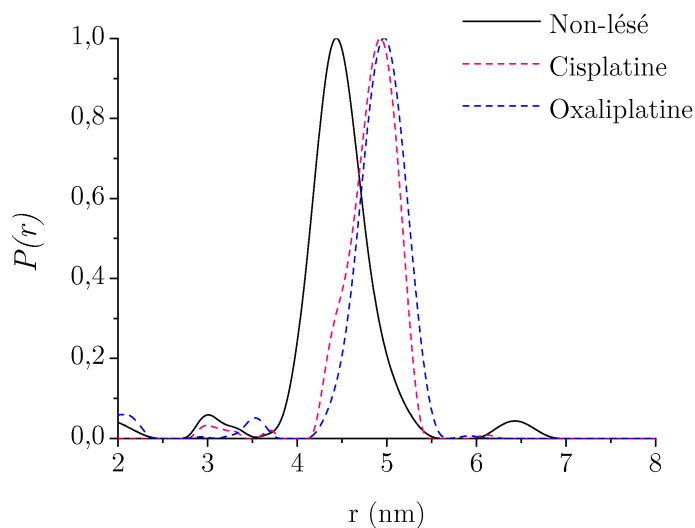


Figure 4.18 – Distribution de distances obtenues par analyse RPE pulsée des duplex non-lésé, “Cisplatine” et “Oxaliplatine” pour le marquage en position 2’ du sucre, après régularisation de Tikhonov.



(a) Distributions de distances.

Duplex	d-(2-15) (nm)	W (nm)	Δd (nm)
non lésé	4,40	0,6	
Cisplatine	4,90	0,6	+ 0,50
Oxaliplatine	5,00	0,6	+ 0,55

(b) Distances mesurées et largeurs des distributions (à 0,05 nm près).

Figure 4.19 – Distribution de distances obtenues par analyse RPE pulsée des duplex non-lésé, “Cisplatine” et “Oxaliplatine” pour le marquage en position 5 de la base, après régularisation de Tikhonov.

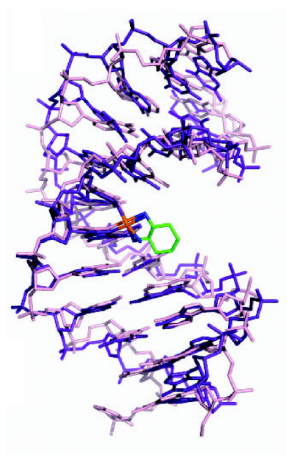


Figure 4.20 – Comparaison des structures, obtenues par modélisation, des duplex contenant les adduits intra-1,2-GpG-cisplatine (en mauve) et intra-1,2-GpG-oxaliplatine (en violet) dans le contexte TGGG [Ramachandran *et al.*, 2009].

conduit à des distributions de distances très larges pour les duplex contenant les lésions platinées ne permettant pas une interprétation claire. Le marquage sur la base nous a néanmoins permis d'obtenir, pour les trois lésions étudiées (THF, intra-1,2-GpG-cisplatine et intra-1,2-GpG-oxaliplatine), des distributions suffisamment fines pour permettre la mise en évidence de changements de distances significatifs entre ces duplex lésés et le duplex non-lésé. Nous avons ainsi conservé cette stratégie de marquage par chimie click en position 5 de la base uracile pour la suite du projet.

4.5 Application à un système complexe en “triangle”

L’approche par la chimie click, que nous avons mise au point, permettant d’obtenir un bi-marquage rigide et ce avec des rendements quantitatifs, nous l’avons appliquée pour construire un système plus complexe, dit en “triangle”. Le principe consiste à introduire trois marqueurs nitroxydes dans la séquence d’un double brin d’ADN afin d’obtenir trois distances distinctes. Ainsi, nous avons accès à trois distances au lieu d’une seule, ce qui apporte des informations complémentaires sur la structure 3D du double brin d’ADN.

Une telle stratégie de triangulation a précédemment été utilisée pour l’étude de protéines. Pour cela, des mutations d’acides aminés ont été introduites, permettant la fixation du marqueur radicalaire. Néanmoins, dans ces études, chaque mutant était uniquement bi-marqué. Ainsi l’étude de plusieurs mutants marqués à des positions différentes permettait la reconstruction de la structure de la protéine [Borbat *et al.*, 2002, Mayor *et al.*, 2010, Bowman *et al.*, 2010]. Une étude basée sur un tri-marquage a récemment été réalisée par Jeschke *et al.* sur une molécule organique [Jeschke *et al.*, 2009]. Cependant, à notre connaissance, aucune étude n’a été réalisée à ce jour sur de l’ADN. Une méthode d’insertion de plusieurs marqueurs sur des nucléotides a néanmoins été décrite mais nécessite l’utilisation d’une polymérase, ce qui peut limiter son application [Obeid *et al.*, 2008]. Dans ce cas, la chimie click, qui permet de très bons rendements de réaction dans des conditions simples, apparaît tout à fait pertinente pour du multi-marquage.

Nous avons donc testé notre stratégie de marquage, par chimie click (sur la base), pour introduire trois nitroxydes au sein d’un double brin d’ADN. De plus, nous l’avons appliqué à un double brin lésé afin de voir si cette chimie était compatible et si l’introduction de ces quatre modifications permettaient encore de déterminer des distances par RPE pulsée. Enfin, nous avons prouvé la pertinence de ce système pour la détection d’interactions ADN-protéine, et montré que la présence des marqueurs ne modifie pas la reconnaissance de l’ADN par une protéine.

4.5.1 Élaboration et étude d’un duplex d’ADN tri-marqué

Conception du système tri-marqué

Nous souhaitons donc construire un double brin d’ADN tri-marqué afin d’obtenir trois distances distinctes. Pour élaborer ce double brin tri-marqué, nous avons utilisé un brin bi-marqué que nous avons hybridé à un brin complémentaire mono-marqué. Nous avons ainsi introduit deux nucléotides alcynes (5-éthynyle-dU) dans un des deux brins, et un nucléotide alcyne dans la séquence de l’oligonucléotide complémentaire. Ces marqueurs ont été placés de sorte à obtenir trois distances distinctes (petite : d-(15-7’), moyenne : d-(2-7’) et grande : d-(2-15), figure (4.21)). De plus, nous souhaitons montrer la pertinence de ce système pour la détection d’une interaction ADN-protéine. Pour cela, nous avons introduit, dans le duplex, un analogue de site abasique (THF) de sorte à pouvoir détecter la reconnaissance et l’incision de celui-ci par une AP-endonucléase, ici l’enzyme EndoIV. Ainsi, le THF a été introduit dans la séquence du brin bi-marqué, entre les deux marqueurs, afin que l’incision de celui-ci induise une perte d’un des nitroxydes conduisant à l’obtention d’une unique distance (dans ce cas, d-(2-7’), figure (4.21)). Pour ce faire, le site substrat doit être placé suffisamment proche d’une extrémité afin que l’incision du THF conduise à la désybridation spontanée du fragment contenant un nitroxyde.

Brin	Séquence 5'→3'
Brin mono-marqué	CAT CTC Y GG ACC TTA C
Brin bi-marqué THF	G Y A AGG TCC AG(THF) GAY G

Tableau 4.4 – Séquences des oligonucléotides utilisés où Y représente le nucléotide 5-éthynyle-TEMPO.

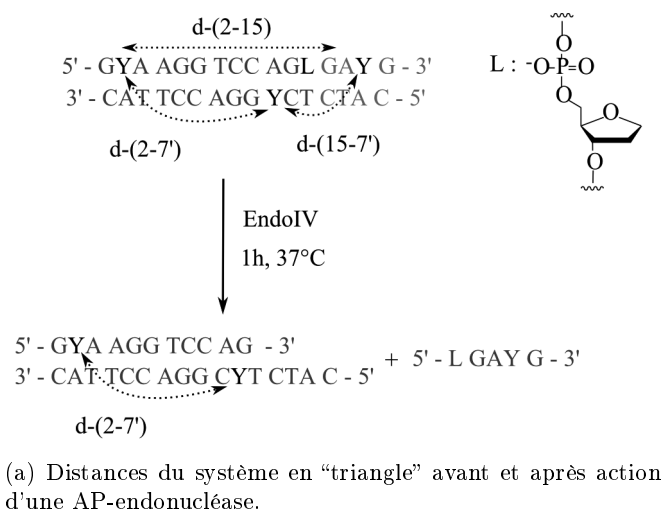


Figure 4.21 – Principe du système en “triangle” élaboré et utilisé pour la détection de l’activité d’incision d’une AP-endonucléase.

Préparation des oligonucléotides et mesures des trois distances

Nous avons synthétisé et purifié les deux brins contenant les nucléotides alcynes, puis les avons marqués par le nitroxyde azido-TEMPO par chimie click comme précédemment (tableau (4.4)). L’avantage de cette chimie est que ses conditions réactionnelles douces permettent de marquer un brin contenant une modification telle que le THF sans l’endommager. Les brins marqués ont été purifiés et contrôlés par spectrométrie de masse.

Les deux brins marqués ont alors été hybridés. Contrairement aux cas précédents nous nous sommes placés en excès de brin non-lésé. En effet, dans tous les cas, l’objectif est de ne pas ajouter de signal parasite. Ainsi, nous nous plaçons toujours en excès du brin complémentaire au brin bi-marqué de sorte que tous les brins bi-marqués soient sous forme de double brin.

Nous avons ensuite réalisé une mesure par RPE pulsée de ce duplex tri-marqué. Comme l’indique la distribution de distances déterminée pour cet échantillon et indiquée sur la figure (4.22) (distribution en ligne noire continue), nous obtenons trois distances distinctes. Les pics correspondant aux deux distances les plus courtes sont relativement fines, tandis que le pic correspondant à la distance la plus grande est assez large. Le tableau (4.22) indique les valeurs de distances obtenues au cours de cette expérience. Ainsi, nous détectons une distance courte de 2,50 nm, une seconde de 3,10 nm et une dernière de 4,55 nm. Nous avons associé chaque distance obtenue aux trois distances attendues : la plus courte : d-(15-7’), la moyenne : d-(2-7’) et la grande : d-(2-15).

Les largeurs des distributions obtenues pour les trois distances sont relativement larges, en

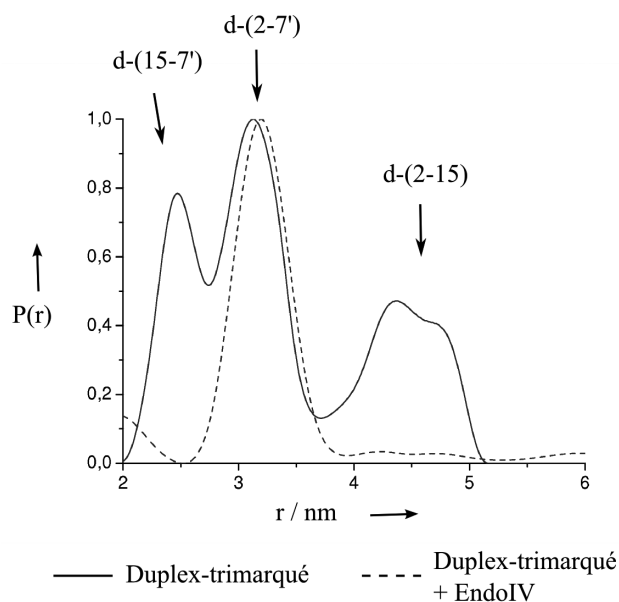


Figure 4.22 – Distributions de distances obtenues par RPE pulsée pour le duplex trimarqué avant et après incubation avec l’AP-endonculéase EndoIV (5 U).

particulier pour la distance la plus grande $d-(2-15)$ (figure (4.22)). Ceci est dû au traitement mathématique utilisé. En effet, le lissage des courbes utilise un paramètre unique pour les trois distances alors qu’il faudrait utiliser des paramètres indépendants. D’autres essais de traitements pourraient ainsi être envisagés afin de minimiser ce phénomène.

Malgré ces imprécisions, nous sommes en mesure de détecter sans difficulté la présence de trois distances distinctes pour le système étudié, conforme à ce que l’on attendait. Nous avons voulu vérifier les valeurs des trois distances mesurées. Pour cela, nous avons calculé ces distances en considérant un modèle de double hélice d’ADN-B, dont la structure était disponible. Les valeurs sont obtenues en mesurant les distances entre les bases et ces dernières sont indiquées dans le tableau (4.5). Elles nous donnent donc une indication même si elles ne tiennent pas compte de la présence ni des nitroxydes ni du résidu THF. Cela nous permet néanmoins de constater que l’ordre de grandeur des distances, prédites par ce modèle, est en accord avec les distances obtenues expérimentalement. De plus, nous avons mesuré précédemment la distance $d-(2-15)$ pour un duplex de séquence similaire non-lésé et contenant un THF. Nous avons ainsi obtenu des distances de 4,40 nm et 4,20 nm respectivement. La valeur que nous mesurons dans le cas du duplex tri-marqué est de l’ordre de 4,6 nm. La distribution associée à cette distance étant très large, il est probable que la distance réelle soit légèrement décalée par rapport à la distance moyenne indiquée, ce qui explique la différence existante avec la distance précédemment obtenue. Nous obtenons néanmoins une valeur de distance de l’ordre de grandeur de ce que nous avons déterminé précédemment.

	distance mesurée (nm)	distance calculée sur une molécule d’ADN-B non modifiée (nm)
d-(15-7’)	2,50	1,86
d-(2-7’)	3,10	2,72
d-(2-15)	4,55	4,47

Tableau 4.5 – Distances obtenues pour le duplex tri-marqué et comparaison avec celles calculées sur une molécule d’ADN-B modèle non modifiée.

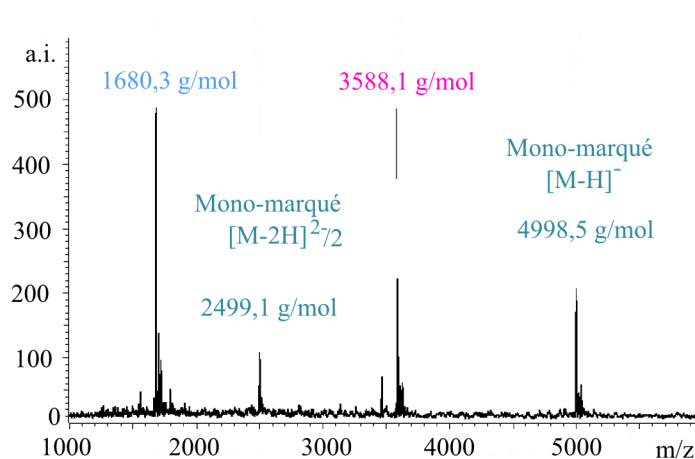
4.5.2 Application à la détection d’une interaction ADN-protéine

Nous avons ensuite appliqué ce système à la détection d’une interaction ADN-protéine, plus précisément à la coupure enzymatique de l’analogue de site abasique THF par une AP-endonucléase. Comme nous l’avons présenté précédemment, le substrat a été placé dans la séquence du brin bi-marqué, de sorte qu’après coupure par une AP-endonucléase, un des trois nitroxydes soit éliminé, tout en gardant l’autre partie du duplex hybridé. Un tel système est d’autant plus pertinent qu’il doit permettre de détecter une coupure même si celle-ci n’est pas complète. En effet, avec ce duplex tri-marqué, nous devrions observer une diminution de l’intensité des distributions de distances pour les distances correspondant au nitroxyde perdu (d-(2-15) et d-(15-7’)) et conserver “l’intensité” initiale pour la distance d-(2-7’) (figure (4.21)).

A titre d’exemple, nous avons choisi d’utiliser l’AP-endonucléase bactérienne EndoIV. Nous avons alors préparé un échantillon de duplex tri-marqué que nous avons fait réagir avec 5 unités de cette enzyme pendant 1 h à 37 °C. Une mesure des distances par RPE pulsée a ensuite été réalisée, dont le résultat est présenté dans la figure (4.22) (distribution finale de distances en pointillés noirs). Dans ces conditions, une seule distance est mesurée à 3,10 nm et correspond à la distance intermédiaire, d-(2-7’). Ce résultat est ainsi conforme à ce que nous attendions, puisque la coupure par EndoIV est censée conduire à la déshybridation du fragment contenant le nitroxyde en position 15 du brin bi-marqué contenant le résidu THF, et ainsi mener à la perte des distances d-(2-15) et d-(15-7’) (figure (4.21)).

Afin de s’assurer que le résultat observé par RPE correspondait bien à la coupure spécifique du THF, nous avons analysé par spectrométrie de masse une partie de l’échantillon utilisé pour la mesure RPE. Le spectre de masse obtenu indique la présence de quatre pics à 4998,5 g/mol, 3588,1 g/mol, 2499,1 g/mol et 1680,3 g/mol (figure (4.23a)).

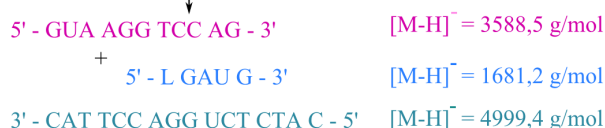
Les masses attendues sont présentées sur la figure (4.23b). Ainsi, le spectre de masse obtenu indique la présence du brin mono-marqué (produit détecté de masse égale à 4998,5 g/mol) ainsi que celle des deux fragments issus de l’incision du THF (produits détectés de masses égales à 3588,1 g/mol et 1680,3 g/mol) (figure (4.23)). Le pic détecté à 2499,1 g/mol correspond à l’ion pseudo-moléculaire de l’oligonucléotide mono-marqué bi-chargé. Nous constatons, sur le spectre MALDI-TOF, l’absence de produit à la masse du brin bi-marqué THF intact (5250,6 g/mol). Ceci nous permet de conclure que l’activité de coupure par EndoIV a bien eu lieu et que celle-ci a été totale. Cette analyse obtenue par spectrométrie de masse est donc totalement corrélée avec le résultat obtenu par RPE pulsée. Enfin, ces résultats indiquent que la présence des marqueurs



(a) Spectre de masse MALDI-TOF.



EndoIV



(b) Masses théoriques des brins du duplex tri-marqué après coupure par EndoIV.

Figure 4.23 – Caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF du mélange réactionnel obtenu par action de l’EndoIV (5 U) sur le duplex trimarqué (3 nmoles de duplex, 1.5 eq du brin mono-marqué) dans le tube RPE.

nitroxydes n’empêche pas l’activité de coupure de cette enzyme, dans le contexte de séquence défini ici.

Nous avons ainsi fait la preuve de concept de ce système en “triangle” pour la mesure de distances par RPE pulsée au sein de duplex d’ADN. Ce système, simple à mettre en oeuvre du fait de la chimie de marquage employée, est applicable à l’étude de toutes sortes de modifications de l’ADN et devrait permettre d’obtenir des informations complémentaires sur la structure de ces molécules. Nous avons également montré que cette stratégie permettait d’étudier des interactions ADN-protéine, dans ce cas une coupure enzymatique, et que la présence des trois marqueurs radicalaires n’empêchaient ni la reconnaissance du substrat ni l’activité de l’enzyme EndoIV.

4.6 Conclusions

Nous avons appliqué la chimie click pour le marquage d'oligonucléotides par le radical nitroxyde TEMPO. L'utilisation de cette méthode nous a permis de "bi-marquer" des oligonucléotides avec des rendements quantitatifs. Deux stratégies de marquage ont été comparées, l'une sur la position 2' du sucre, et l'autre sur la position 5 de l'uridine. Pour ces deux stratégies, la position du greffage était donc différente tout comme la longueur du "linker" reliant le radical au nucléotide. Nous avons ainsi montré que ces deux marquages permettaient de mesurer des distances entre les deux radicaux insérés au sein d'un double brin non lésé, cohérentes avec ce que nous avons prédit par modélisation.

Ces deux méthodes de marquage ont été appliquées à l'étude de la déformation induite par la présence de l'analogue de site abasique THF au sein d'un double brin d'ADN. Une diminution de la distance séparant les deux nitroxydes a ainsi été observée, pour ces deux marquages, et a été corrélée avec des mesures précédemment réalisées au laboratoire. Nous avons également étudié les adduits majoritairement formés par les composés utilisés en chimiothérapie : le cisplatine et l'oxaliplatine. Cependant, les résultats obtenus dans ce cas nous ont montré que le marquage sur le sucre était peu satisfaisant pour ce type d'étude, puisqu'il mène à des distributions de distances très larges, ne permettant pas une mesure précise de distance. Suite à cela, nous avons sélectionné le marquage sur la base, qui permet d'obtenir des distributions de distances relativement fines et suffisantes pour les études des lésions nucléiques que nous envisagions.

Nous avons conçu un système de marquage en "triangle", qui permet d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure de l'ADN étudié. Le marquage de ce système complexe a été possible grâce à la chimie click qui se réalise dans des conditions suffisamment douces pour ne pas nécessiter de précautions particulières pour marquer un oligonucléotide contenant des lésions nucléiques. Ainsi, nous avons été capables d'insérer quatre modifications dans un duplex d'ADN dont trois radicaux nitroxydes. Ce système en "triangle" nous a permis de détecter simultanément trois distances séparant les trois nitroxydes insérés dans un duplex contenant l'analogue de site abasique THF. Ce système a alors été appliqué pour la détection d'une interaction ADN-protéine. En effet, nous avons observé, pour la première fois par RPE pulsée, une activité enzymatique, celle de l'enzyme EndoIV. Ceci nous a permis de vérifier que les marqueurs nitroxydes, insérés sur la position 5 de la base uracile, ne gênaient pas l'action de l'enzyme étudiée, EndoIV.

Nous avons vu qu'il n'était pas possible de trouver une explication aisée aux résultats des mesures de distances sur les duplex contenant les adduits platinés. Dans ce cas, il est important de disposer de modélisations structurales précises en soutien des résultats expérimentaux obtenus. Des essais de modélisations, par l'équipe de Y. Boulard, ont été réalisés mais se sont révélés très compliqués à mettre en oeuvre et n'ont pas permis, à ce jour, de remonter aux résultats obtenus pour les duplex contenant les adduits platinés. Cela nécessiterait d'autres développements et nous pourrions également envisager de modifier le système étudié afin d'obtenir des informations supplémentaires sur la structure de la molécule. Nous pourrions, par exemple, reprendre cette étude en utilisant le système de marquage en "triangle" que nous avons développé récemment.

Cette approche de système tri-marqué pourrait à l'avenir, nous permettre d'étudier d'autres modifications de l'ADN et également d'autres interactions ADN-protéine. Nous pourrions, par exemple, marquer une protéine par un nitroxyde et regarder son interaction avec les marqueurs

incorporés sur la molécule d'ADN. Pour simplifier la mesure, il est également envisagé d'utiliser un radical différent contenant un atome d'azote ^{15}N . En effet, les propriétés de l'azote ^{15}N étant différentes de l'azote ^{14}N , il est possible de cibler spécifiquement les interactions faisant intervenir cet atome ou, au contraire, regarder uniquement les autres [Jeschke *et al.*, 2006b]. La combinaison de marquages utilisant ces deux noyaux est particulièrement intéressante dans le cas de systèmes complexes pour lesquels sont introduits plusieurs nitroxydes. De plus, dans le cas d'un double brin tri-marqué, nous avons vu qu'il était important de choisir des distances significativement différentes, afin que les distributions de distances ne se recouvrent pas. L'utilisation du double marquage $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ permettrait donc de faciliter la détermination de ces distances.

Conclusions et perspectives

Biopuces à ADN pour la mesure des activités de réparation par excision de base et par réversion

La réparation de l'ADN est un processus essentiel pour le maintien de l'intégrité génomique. Paradoxalement, une trop grande efficacité de réparation n'est parfois pas souhaitable, notamment lors des traitements anti-tumoraux ayant pour cible l'ADN. De plus, de nombreux liens ont été établis entre les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et le cancer, en terme de prédisposition, de marqueur biologique ou encore de réponse aux traitements anti-tumoraux. Ainsi, les mécanismes complexes des différentes voies de la réparation de l'ADN sont importants à étudier, d'une part afin de mieux les connaître et d'autre part dans l'objectif de mieux cibler les stratégies de traitement. De nombreux outils ont été développés afin d'étudier ces processus mais chacun possède ses avantages et ses inconvénients si bien qu'aucun ne s'est imposé pour une utilisation en routine.

Nous appuyant sur l'expertise du laboratoire concernant l'étude des lésions de l'ADN et de leur réparation, et en partenariat avec une équipe du LETI, nous avons conçu une nouvelle biopuce à ADN capable de mesurer, par fluorescence, ces activités enzymatiques de réparation.

Dans un premier temps, nous avons mis au point les conditions de greffage, par chimie click, des sondes oligonucléotidiques simple brin sur des lames de verre fonctionnalisées. Puis nous avons réalisé une première preuve de concept de ce système de biopuce à oligonucléotides en duplex pour la détection d'activités enzymatiques de la voie de la BER.

Nous avons ensuite travaillé au développement d'un nouveau système, plus adapté pour ces applications, basé sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques en forme d'épingle à cheveux ("hairpin"). Ainsi nous avons, dans un premier temps, ciblé les activités d'excision par les glycosylases et d'incision par les AP-endonucléases, toutes deux impliquées dans la réparation par excision de base (BER). Les résultats ont permis de valider ce nouvel outil pour la détection des activités des glycosylases UNG et Aag ainsi que l'AP-endonucléase Ape1, à partir des enzymes purifiées ou d'extraits cellulaires. Nous avons également montré que ce test pouvait être applicable à l'étude d'inhibiteurs de la réparation. Enfin, ce biocapteur a été utilisé pour réaliser l'analyse des activités de réparation de lignées humaines de gliomes différant dans leur réponse à l'agent anti-tumoral méthylant, témozolomide. Cette étude nous a permis de mettre en évidence des différences de profil de réparation pour ces lignées.

La biopuce, premièrement conçue pour mesurer les activités de la BER, a été adaptée pour la détection des activités de réversion de l'enzyme MGMT. Cette enzyme "suicide" fait l'objet de nombreuses études et semble impliquée dans la réponse aux traitements anti-tumoraux alkylants.

Néanmoins, cette enzyme agissant par un mécanisme de réversion, n'étant pas régénérée, et étant présente en faible quantité dans les cellules, la mise au point d'un test fonctionnel simple, dédié à cette activité, est délicate. Utilisant notre système de biopuce nous avons été en mesure de développer un test fonctionnel pour détecter cette activité enzymatique à partir de l'enzyme purifiée ou d'un extrait cellulaire.

Le système de biopuce apparaît donc très prometteur pour analyser, par une mesure de fluorescence, ces activités de réparation (BER et réversion) en parallèle. Ce type de biocapteur permet l'étude de nombreuses activités enzymatiques à partir d'un seul outil. Ceci pourrait donc aider à la compréhension des mécanismes fondamentaux de ces voies de réparation. Nous en avons fait une preuve de concept lors de l'étude de lignées cancéreuses ce qui ouvre la voie à d'autres études similaires qui pourraient permettre d'étudier l'existence d'un lien entre ces activités de réparation et la résistance des cellules à divers stress. Une des applications les plus prometteuses de ce type de biocapteur est le criblage d'inhibiteurs de la réparation. En effet, pour tester l'action d'une molécule sur les différents protéines de la réparation, il est important de pouvoir multiplexer les analyses. Ainsi, le biocapteur que nous avons développé pourrait permettre de tester aisément de nombreuses molécules sur plusieurs enzymes de la réparation de manière simultanée. Nous avons montré que la biopuce pouvait servir à ce type d'application et nous pouvons envisager d'augmenter le nombre de sondes substrats afin de cibler d'autres enzymes de la réparation.

Nous avons néanmoins constaté certaines limitations à ce système. Tout d'abord, des développements pourraient permettre d'augmenter les performances de ce test bien que celui-ci soit actuellement suffisamment sensible pour l'analyse des activités de réparation ciblées ici. Une des principales limitations des biopuces vient de leur fabrication qui reste assez lourde et délicate à mettre en place. C'est pourquoi nous avons travaillé en parallèle au développement d'un système similaire de sondes substrats supportées sur des billes fonctionnalisées. Ce système, qui reprend les principales caractéristiques du biocapteur présenté ici, est beaucoup plus souple dans sa fabrication et dans ses conditions d'utilisation, ce qui devrait faciliter le développement et la validation de ces tests enzymatiques. Les premières études réalisées au laboratoire ont permis de faire la preuve de concept de ce système de billes fonctionnalisées pour la mesure des activités de la BER et vont être poursuivies pour étendre ce concept à d'autres activités de réparation de l'ADN.

En conclusion, l'expérience acquise au cours de ce travail me permet de constater qu'il n'existe pas de système idéal et que le choix du test à utiliser doit être adapté selon l'application que l'on souhaite réaliser. Par exemple, si l'on souhaite mesurer uniquement l'activité de l'enzyme Ape1 à partir d'un extrait cellulaire, celle-ci est suffisamment élevée pour être détectée par une méthode traditionnelle d'analyse PAGE par fluorescence. En revanche, si l'objectif est de détecter diverses activités de réparation à partir d'un même échantillon, l'utilisation d'un système miniaturisé comme celui que nous avons mis au point, est particulièrement intéressant puisqu'il permet de paralléliser les mesures. De même, nous avons vu que dans ces conditions expérimentales, l'analyse par la technique PAGE, de l'activité de la glycosylase Aag était difficile du fait de la faible activité de celle-ci. Dans ce cas, la biopuce mise au point nous a permis de mesurer cette activité sans difficulté. De même pour le screening d'inhibiteurs à haut débit, il est difficilement envisageable de réaliser l'ensemble des analyses par les techniques traditionnelles d'analyse PAGE. Ainsi, un système de biocapteur comme celui que nous avons développé paraît particulièrement pertinent

pour observer l'effet de chaque molécule inhibitrice sur plusieurs enzymes de la réparation.

Sondes nucléiques paramagnétiques pour l'analyse structurale des lésions de l'ADN par RPE pulsée

Parallèlement à la mise au point des biopuces dédiées à la mesure des activités de réparation de l'ADN, nous avons mené des études structurales par RPE pulsée visant à analyser les déformations induites par diverses lésions au sein de l'ADN. La RPE pulsée repose sur l'analyse des interactions dipolaires entre deux spins électroniques portés par des marqueurs radicalaires. Ainsi, il est possible, par cette technique, de mesurer la distance séparant ces deux spins, avec une précision de quelques Å. L'utilisation de la chimie click nous a permis d'introduire spécifiquement, avec des rendements quasi-quantitatifs, jusqu'à trois marqueurs radicalaires au sein d'un duplex d'ADN contenant une lésion.

Nous avons étudié plusieurs stratégies de marquage de l'ADN (marquage sur le sucre par rapport à un marquage sur la base nucléique) et les avons appliquées à l'étude d'un analogue de site abasique et aux adduits majoritairement formés par les agents antitumoraux cisplatine et oxaliplatine. Les résultats obtenus, par RPE pulsée, ont montré des différences structurales significatives entre les duplex non-lésés et ceux contenant les altérations.

La méthode de marquage développée, basée sur une approche performante de chimie click, a permis d'introduire trois radicaux nitroxydes au sein d'un duplex d'ADN. Ce concept de tri-marquage est particulièrement intéressant puisqu'il permet d'obtenir trois distances au lieu d'une seule et apporte ainsi des informations complémentaires sur la structure de la molécule étudiée. Nous avons appliqué ce système, pour la première fois, à l'étude d'une interaction ADN-protéine, dans notre cas une activité d'incision d'une enzyme de la réparation de l'ADN.

L'étude par RPE pulsée de sondes nucléiques paramagnétiques tri-marquées ouvre des perspectives nouvelles. Tout d'abord, cela nous permet d'accéder à des informations supplémentaires sur la structure de la molécule. Ainsi nous pourrions étendre ce principe à l'étude structurale d'autres dommages de l'ADN. Dans le cas présenté au cours de ce travail, il est néanmoins nécessaire de construire le double brin d'ADN de sorte à obtenir trois distances significativement différentes, qui ne se recouvrent pas, ce qui peut être une limitation. Néanmoins, nous envisageons de marquer l'ADN avec plusieurs types de nitroxydes (^{14}N et ^{15}N) dont les propriétés physiques diffèrent. Ainsi, il est théoriquement possible de sélectionner spécifiquement l'un ou l'autre de ces nitroxydes et de s'affranchir du problème de recouvrement des distances.

Nous envisageons également d'étendre ce principe de tri-marquage à l'étude d'autres interactions ADN-protéines. A titre d'exemple, nous pourrions observer l'effet de la fixation d'une protéine sur un duplex d'ADN en mesurant les trois distances (courbure, torsion...). Nous pourrions également marquer la protéine avec un résidu nitroxyde et mesurer les distances entre ce marqueur et ceux introduits dans un duplex d'ADN.

En conclusion, ce travail a montré le potentiel et la pertinence de cette stratégie de marquage par chimie click pour l'insertion de marqueurs radicalaires. Sa facilité de mise en œuvre et les hauts rendements obtenus permettent ainsi d'envisager la construction de nombreux systèmes paramagnétiques pour étudier un large panel de lésions de l'ADN ou encore d'interactions ADN-protéines.

Chapitre 5

Matériels et méthodes

Sommaire

5.1	Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques	176
5.2	Caractérisation des sondes oligonucléotidiques	177
5.3	Analyse d'une activité enzymatique en solution à l'aide d'une sonde hairpin	178
5.4	Protocoles liés aux biopuces	179
5.4.1	Fonctionnalisation des lames azotures	179
5.4.2	Tampons et réactifs	180
5.4.3	Immobilisation des sondes oligonucléotidiques sur support par "chimie click"	180
5.4.4	Protocole d'hybridation pour la détection de mismatch sur lames	181
5.4.5	Protocole d'hybridation et d'incubation enzymatique pour les lames "hairpins"	182
5.4.6	Détection de l'activité de la MGMT sur lame	182
5.4.7	Détermination de la densité des lames	183
5.5	Enzymes et tampons enzymatiques utilisés	183
5.6	Préparation d'un extrait nucléaire à partir de cellules	183
5.7	Protocoles liés aux analyses par RPE pulsée	185
5.7.1	Marquage des sondes par des nitroxydes par chimie click	185
5.7.2	Mesures des températures de fusion	185
5.7.3	Préparation des échantillons pour les analyses en RPE pulsée	186
5.7.4	Détermination des distances par RPE pulsée	186
5.7.5	Préparation des oligonucléotides contenant les lésions platinées	186
5.7.6	Digestion par les exonucléases des oligonucléotides contenant les lésions platinées	187
5.7.7	Préparation des sondes nucléiques duplex "tri-marquées"	187

5.1 Synthèse et purification des sondes oligonucléotidiques

Les oligonucléotides utilisés sont synthétisés à l'échelle de 1 μ mole avec un synthétiseur d'ADN ABI 392 (Applied Biosystems). La synthèse est effectuée selon la voie phosphoramidite sur support dans le sens 3' vers 5'. Les phosphoramidites normaux et modifiés ainsi que les colonnes utilisées sont d'origine commerciale (Glen Research). Le phosphoramidite 2'-O-propargyl uridine est fourni par GeneCust et le phosphoramidite 5-éthynyle-désoxyuridine par Berry & associates. Les synthons phosphoramidites utilisés sont préalablement mis en solution dans de l'acétonitrile anhydre. Lors de la synthèse, la première étape consiste à déprotéger la position 5' du premier 5'-diméthoxytrityle-2'-désoxynucléoside, fixé sur la colonne par son extrémité 3'-OH, avec de l'acide trichloroacétique à 2 % dans du dichlorométhane. Le phosphoramidite suivant est alors activé par réaction avec du tétrazole pour permettre la réaction de couplage (environ 30 secondes). S'ensuit une étape d'oxydation du phosphore à l'iode (0,02 M dans un mélange eau/pyridine/THF). Enfin, une étape de "capping", par une solution d'anhydride phénoxyacétique et de méthyle imidazole dans du THF, permet l'inactivation des groupements qui n'auraient pas réagi lors de l'étape de couplage. Le cycle de synthèse est répété jusqu'au dernier nucléotide de la séquence désirée. Pour des raisons de commodités de purification, le dernier nucléotide n'est pas détritylé.

Les oligonucléotides sont ensuite déprotégés. Pour cela, les supports solides sont transférés dans des tubes eppendorf à bouchon vissé et 1 mL d'une solution ammoniacale à 30 % est ajouté. Le traitement de déprotection est réalisé pendant une nuit à 50°C avec une agitation régulière. Le surnageant est récupéré et l'ammoniaque est évaporé au SpeedVac. Les oligonucléotides sont alors repris dans du TEAA 10 mM et sont filtrés (filtres, 0,45 μ m Milipore). Les conditions de déprotection sont modifiées pour les oligonucléotides contenant les lésions O⁶-méthylguanine et 8-oxoguanine. Ainsi, les oligonucléotides contenant la base modifiée O⁶-méthylguanine, sont déprotégés dans du méthanol contenant 10 % de DBU (1,8-diazabicycloundec-7-ene), pendant cinq jours à température ambiante à l'abri de la lumière. Les oligonucléotides contenant la base oxydée 8-oxoguanine, sont déprotégés dans l'ammoniac contenant 0,25 M de 2-mercaptoéthanol, afin d'éviter l'oxydation de cette base, pendant une nuit (17 h) à 55 °C.

La purification des sondes est réalisée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur une colonne polymérique (Hamilton PRP3, 10 μ m, 7x305 mm) via une méthode de détritylation en ligne. Pour cela, nous utilisons un premier gradient linéaire d'acétonitrile (0 à 10 % d'AcN) dans du TEAA 10 mM (acétate de triéthylammonium) afin d'éluer les arrêts de synthèse. De l'acide trifluoroacétique à 1 % (TFA) est ensuite injecté sur la colonne afin de détrityler les oligonucléotides fixés sur celle-ci. Enfin, un deuxième gradient en acétonitrile permet l'élution du produit final de synthèse recherché. Les gradients sont adaptés suivant les sondes à purifier, mais une table de gradient classiquement utilisée est indiquée dans le tableau (5.1).

Dans le cas des sondes hairpins, une première purification avec un gradient linéaire sur une colonne Hypersil HS C18 est réalisée au préalable (gradient 4-24 % d'AcN dans TEAA 10 mM en 42 minutes). Le pic correspondant au produit tritylé recherché est alors récolté, concentré par évaporation et purifié avec détritylation en ligne suivant une méthode similaire à celle exposée plus haut. Notons néanmoins, que les rendements de synthèse de ces sondes longues contenant plusieurs modifications sont relativement faibles (10 à 20 % au final), ce qui rend la purification par HPLC délicate.

Temps (min)	% de TEAA	% d'AcN	% de TFA
0	100	0	0
3	100	0	0
10	90	10	0
12	90	10	0
13	100	0	0
23	100	0	0
24	0	0	100
34	0	0	100
35	100	0	0
45	100	0	0
65	85	15	0
66	10	90	0
69	10	90	0
70	100	0	0

Tableau 5.1 – Table de gradient classiquement utilisée pour la purification des oligonucléotides courts.

Une fois les oligonucléotides purifiés, ils sont dessalés sur colonne d'exclusion en réalisant une élution avec de l'eau milliQ (NAP-10 ou NAP-25 selon la quantité d'oligonucléotide, General Electric HealthCare). Ils sont alors lyophilisés avant d'être repris dans de l'eau milliQ pour ajuster la concentration (100 μ M dans le cas des sondes utilisées pour le spotting sur lame).

5.2 Caractérisation des sondes oligonucléotidiques

Quantification

Les oligonucléotides sont ensuite quantifiés via une mesure UV (à 260 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre en goutte Nanodrop D-1000 (Thermo scientific).

Analyse par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (r-HPLC)

La pureté des oligonucléotides est contrôlée par chromatographie HPLC en système analytique avec un appareil Agilent Technologies 1200 Series (Agilent Technologies) avec une colonne C18 (300 Å, 5 μ m, 250x4,6 mm). Les produits sont détectés par absorbance UV à 260 nm et par fluorescence (excitation 546 nm, émission 563 nm pour le cy3). Pour les sondes contenant le quencheur dabcyI, nous utilisons également une détection en absorbance à 453 nm.

Analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Les oligonucléotides ont également été contrôlés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (désorption et ionisation laser assistées par matrice en association à un analyseur en temps de vol) par C. Saint-Pierre sur un appareil Biflex (Bruker). La matrice utilisée est constituée d'acide 3-hydroxypicolinique (35 mg) dissoute dans 1 mL d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium (100 μ M). L'échantillon, en général 3 μ L d'une solution à 5 μ M (sauf pour les oligonucléotides longs où il est parfois nécessaire d'utiliser des quantités plus importantes), est alors dessalé sur

des billes de résine échangeuse d'ions résine (Dowex, Dow). 1 μL de la solution est ensuite déposé sur la cible auquel est ajouté 1 μL de solution de matrice. L'appareil est calibré avec une solution d'oligonucléotide de masse connue et l'analyse des échantillons est réalisée lorsque les cristaux sont formés à la surface de la cible.

Analyse par électrophorèse sur gel d'acrylamide (PAGE) en conditions dénaturante

Préalablement à l'électrophorèse, 500 mL de solution d'acrylamide à 20 % sont préparés en mélangeant 250 mL de solution de polyacrylamide (19 : 1 acrylamide : bis-acrylamide, Sigma-Aldrich) à 40 % et 50 mL de tampon TBE 10X (Tris borate EDTA, Invitrogen). 210 g d'urée (Sigma-Aldrich) sont ajoutés et dissous à chaud. La solution est complétée à 500 mL avec de l'eau milliQ et est filtrée sur fritté. Les plaques, les espaceurs et les peignes sont lavés au détergent puis rincés à l'eau et à l'éthanol. 1 mL de diméthylchlorosilane (Supelco) à 10 % dans du dichlorométhane est appliqué sur la face interne des plaques pour faciliter le démoulage final du gel. La polymérisation du gel est initiée en ajoutant 700 μL de solution de persulfate d'ammonium (APS, Interchim) à 10 % puis 70 μL de TEMED pour 100 mL de la solution d'acrylamide à 20 %. Une fois coulé et polymérisé, le gel est préchauffé à 1000 V en limitant la puissance à 4 W pendant une nuit. Les échantillons (typiquement 1 pmole d'oligonucléotide dans 10 μL) préalablement dénaturés par chauffage (90 °C pendant 2 min) dans 5 μL d'une solution de bleu dans la formamide (90 % formamide, 0,02 % xylène cyanole, 0,02 % bleu de bromophénol) sont alors déposés dans les puits (pour 1,1 mL de solution de bleu : 2,5 mg bleu bromophénol + 2,5 mg xylène cyanol + 200 μL TBE 2X + 900 μL formamide).

La migration des échantillons s'effectue à 1500 V en limitant la puissance à 20 W. Lorsque les échantillons ont suffisamment migré, le gel est démoulé puis analysé à l'aide d'un scanner de fluorescence Typhoon (General Electric HealthCare) à la longueur d'onde du fluorophore utilisé (laser à 546 nm), à une résolution de 100 μm . Le gain du photomultiplicateur est ajusté pour avoir le meilleur signal sans être à saturation (typiquement 450 V pour 1 pmole déposée sur un gel de 0,5 mm d'épaisseur).

5.3 Analyse d'une activité enzymatique en solution à l'aide d'une sonde hairpin

Analyse PAGE couplée à une détection fluorescente

La première étape consiste à s'assurer que la sonde utilisée est sous forme double brin (étape d'auto-hybridation). Pour cela, une solution de sonde à 1 μM dans le tampon enzymatique 1X désiré est préparée. La solution est alors portée à 90 °C pendant 2 minutes puis nous la laissons redescendre lentement à température ambiante.

Dans un tube éppendorf, nous ajoutons alors 1 pmole de la sonde hairpin auto-hybridée qui est incubée 1 h à 37 °C en présence de l'enzyme ou de l'extrait cellulaire à analyser, dans un volume final de 10 μL . A la fin de la réaction, 3 μL de solution de bleu dans la formamide (préparation décrite dans le paragraphe précédent) sont ajoutés, et le tout est chauffé 2 minutes à 90°C. L'échantillon est alors déposé sur un gel d'acrylamide à 20 % dénaturant et analysé selon

la méthode exposée au paragraphe précédent.

Analyse PAGE couplée à une détection radioactive

Dans un premier temps l'oligonucléotide est marqué au ^{32}P . Pour cela 10 à 40 pmoles d'oligonucléotide sont dilués dans 10 μL d'eau. 3 μL de tampon 5X de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (Invitrogen), 1 μL de T4 polynucléotide kinase et 1 μL de $[\gamma -^{32}\text{P}]$ -ATP (Amersham biosciences) sont ajoutés. Le mélange est incubé 1 h à 37°C puis 35 μL d'eau milliQ sont ajoutés. La solution est alors purifiée sur une colonne d'exclusion de type G-25 microspin (General Electric Healthcare) afin d'éliminer l'excès d'ATP libre.

La réaction enzymatique que l'on souhaite étudier est alors réalisée dans des conditions similaires à celles décrites pour l'oligonucléotide fluorescent.

L'échantillon est ensuite également déposé sur gel. Une fois l'électrophorèse réalisée, le gel est démoulé et un écran réactif est placé contre ce dernier (pendant 1 h à 1 nuit selon l'ATP radioactif utilisé). L'écran est ensuite lu avec un scanner de type personal molecular Imager (BioRad).

Dans le cas de l'étude menée sur la MGMT, le protocole a été légèrement modifié. Dans un premier temps l'oligonucléotide (1 pmoles) est incubé avec l'enzyme MGMT purifiée (Alexis, Enzo Life sciences) dans son tampon 1 X, dans un volume de 10 μL pendant 1 h à 37°C . 1,5 μL de tampon 10 X de Pst1 (Invitrogen), 2,5 μL d'eau milliQ et 1,5 μL de PstI (10 U/ μL) sont alors ajoutés. La solution est alors incubée 1 h à 37°C . A la fin de la réaction, 3 μL de solution de bleu dans la formamide sont ajoutés et le mix est chauffé 2 min à 90°C . La solution est alors déposée sur un gel d'acrylamide (20 %) dénaturant et analysé comme précédemment.

5.4 Protocoles liés aux biopuces

5.4.1 Fonctionnalisation des lames azotures

La fonctionnalisation des lames est réalisée par G. Costa du laboratoire de Fonctionnalisation et Chimie pour les Microsystèmes du CEA-grenoble (LETI/DTBS).

Les lames de verres sont tout d'abord hydratées avec une solution "Brown" ($\text{NaOH}/\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$: 1,4 g de NaOH + 150 mL d'eau milliQ + 200 mL d'EtOH (éthanol)). Elle sont alors silanisées une nuit à 80°C avec 526 μL de triméthoxy-hexane-chlorosilane (SIKEMIA) dilué dans 300mL de toluène. Les lames sont alors rincées avec de l'acétone pendant 5 min sous ultra-sons, puis avec de l'éthanol 5 min sous ultra-sons et enfin avec de l'eau milliQ. Elles sont alors séchées par centrifugation (1000 tr/min). Les lames sont alors placées 3 h dans une étuve à 110°C (étape de recuit permettant la réticulation des fonctions Si). Les fonctions chlorure sont ensuite substituées par un azoture. Pour cela, on fait réagir les lames avec l'azoture de sodium (NaN_3 / 1,5 g dissout dans 300 mL de DMF), 24 h à 80°C , à reflux. Les lames sont ensuite rincées dans des bains plongés dans un bain à ultra son, 5 min avec de l'eau milliQ, puis 5 min avec de l'acétone et enfin 5 min avec du dichlorométhane. Les lames sont alors séchées par centrifugation et stockées sous azote jusqu'à utilisation.

5.4.2 Tampons et réactifs

Tampon “A” de spotting 2 M

237,8 mg de formiate de potassium (Sigma-Aldrich) sont dissous dans 10 mL d’eau milliQ. La solution est ensuite filtrée sur un filtre Millipore.

Solution de Cu(I) 1 mM

1,9 mg de iodure de cuivre (CuI, Sigma-Aldrich) est dissous sous ultra-son dans 1 mL d’acétonitrile puis 100 μ L de cette solution sont dilués dans 900 μ L d’acétonitrile.

Solution de DIPEA 5 mM

8,7 μ L de DIPEA (Diisopropyléthylamine, (Sigma-Aldrich) sont dilués dans 992 μ L d’eau milliQ puis 100 μ L de cette solution sont dilués dans 900 μ L d’eau miliQ.

Tampon d’hybridation et solutions de lavage

Le tampon d’hybridation 1 M (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,1 mM EDTA (pH 7,8), Triton 0,05 %) ainsi que les solutions de lavage (0,3 M ou 0,03 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA (pH 7,8), Triton 0,05 %) des lames sont préparés suivant le tableau ci-dessous :

	Tampon d’hybridation 1 M	Solution de lavage 0,3 M	Solution de lavage 0,03 M
NaCl 5 M	200 mL	60 mL	6 mL
Tris-HCl 1 M pH8	10 mL	10 mL	10 mL
EDTA 0,5 M pH7.8	2 mL	2 mL	2 mL
Triton X-100 10%	5 mL	5 mL	5 mL
Eau milliQ	qsp 1 L	qsp 1 L	qsp 1 L

Tableau 5.2 – Préparation du tampon d’hybridation et des solutions de lavage (volumes pour 1 L de solution finale).

5.4.3 Immobilisation des sondes oligonucléotidiques sur support par “chimie click”

Préparation de la solution de sonde à spotter

Pour chaque sonde 25 μ L de solution à spotter, contenant la sonde à 10 μ M final, 5 équivalents (eq) de iodure de cuivre et 25 eq de DIPEA, sont préparés comme indiqué ci-dessous :

	Tampon A	Sonde (100 μ M)	CuI (1 mM)	DIPEA (5 mM)
V (μ L)	20	2,5	1,25	1,25

Tableau 5.3 – Préparation de la solution de sonde à spotter.

Spotting des solutions de sondes

Les solutions sont déposées dans un réservoir de type micro-plaque placée à l'endroit adéquat sur un robot Piezoarray (PerkinElmer). Celui-ci dépose 2 gouttes de 350 pL par spot. Une fois les lames spottées suivant le plan de dépôt souhaité, les blocs sont gravés avec une pointe de diamant. Les lames sont alors placées dans des boîtes à température ambiante, à l'abris de la lumière, pour la nuit. Le lendemain, ces dernières sont lavées dans un bain de SDS 0,2 % pendant 5 minutes, à température ambiante puis dans un bain d'eau milliQ pendant 5 minutes, à température ambiante. Elles sont ensuite séchées par centrifugation 3 minutes à 600 g.

5.4.4 Protocole d'hybridation pour la détection de mismatch sur lames

Un cache auto-adhésif (Grace Bio-Labs) est placé sur chaque lame délimitant les chambres d'incubation (volume d'environ 17 μ L) pour les différents blocs de la lame (figure (5.1)).

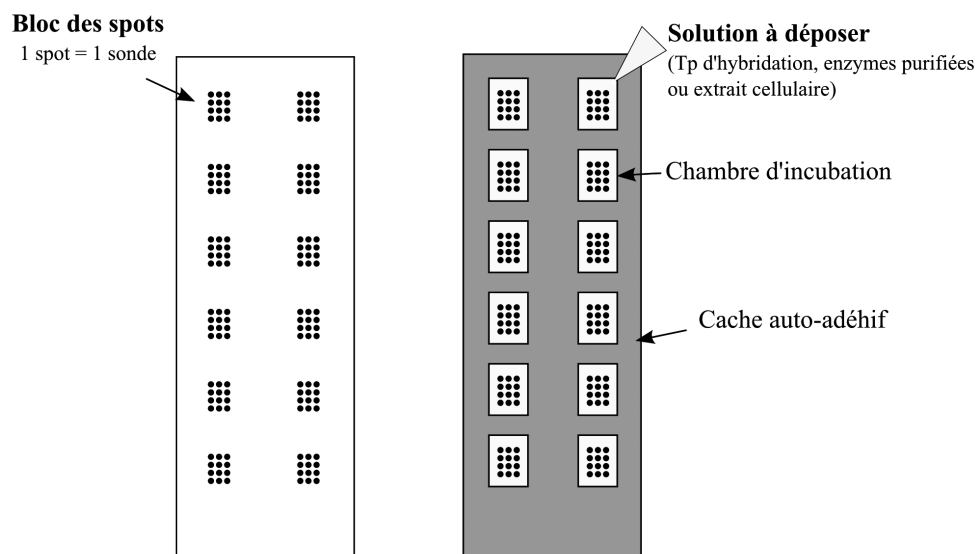


Figure 5.1 – Incubation des blocs d'une lame fonctionnalisée à l'aide de caches auto-adhésifs.

Les chambres d'incubation sont alors remplies avec une solution de cible à 10 nM diluée dans du tampon d'hybridation 1 M et recouvertes d'un film auto-collant afin d'éviter l'évaporation. Les lames sont placées dans une étuve à 37 °C pendant 1 h. Elles sont ensuite lavées avec la solution de lavage à 0,3 M, (5 min à température ambiante) puis avec la solution de lavage à 0,03 M. Elles sont alors séchées par centrifugation (3 min à 600 g). Les lames sont lues à 532 nm avec une résolution de 5 μ m sur une scanner Genepix 4200A scanner (Axon Instruments). Le gain du photomultiplicateur est réglé en fonction du signal obtenu de sorte à ne pas saturer le

détecteur. La fluorescence des spots est alors quantifiée avec le logiciel Genepix Pro 5.1 (Axon Instrument).

5.4.5 Protocole d'hybridation et d'incubation enzymatique pour les lames "hairpins"

Après l'étape de spotting des sondes sur les lames, et une fois ces dernières lavées et séchées, on procède à une étape de "ré-hybridation". Cette étape consiste à déshybrider les sondes auto-complémentaires puis à les ré-hybrider. Ce processus semble important puisque, après l'étape de spotting, nous ne pouvons pas nous assurer de la configuration exacte dans laquelle se trouve les sondes hairpins (simple ou double brin). Pour cela, les lames sont plongées 2 x 20 secondes dans de l'eau milliQ bouillante à l'aide d'un porte lames (protocole adapté de [Strohsahl *et al.*, 2007]). Un cache auto-adhésif est alors placé sur les lames et les chambres d'incubation sont remplies avec du tampon d'hybridation 1 M. Les lames sont placées dans une étuve à 50 °C pendant 1 h. Elles sont ensuite lavées avec les solutions de lavage (0,3 M puis 0,03 M) 5 min à température ambiante, puis séchées par centrifugation (3 minutes à 600 g).

Les lames sont alors lues suivant le protocole décrit au paragraphe précédent. Une fois validée (CV pour chaque sonde < 15 %), un nouveau cache est placé sur chaque lame et les chambres d'incubation sont remplies avec les solutions enzymatiques à étudier. Les lames sont alors mises à incuber 1 h à 37 °C avant d'être à nouveau lavées, séchées, lues et quantifiées comme précédemment.

5.4.6 Détection de l'activité de la MGMT sur lame

Dans le cas des expériences menées sur la MGMT, le protocole est légèrement modifié.

Pour l'enzyme purifiée, après l'étape d'hybridation, un cache adhésif est placé sur la lame et les chambres d'incubation sont remplies avec la solution contenant l'enzyme dans son tampon (volume d'environ 17 µL). La lame est alors placée dans une étuve 2 h à 37 °C. La lame est ensuite lavée avec les solutions de lavage (0,3 M puis 0,03 M) 5 minutes à température ambiante avant d'être séchée par centrifugation (3 minutes à 600 g). Un nouveau cache adhésif est alors placé sur la lame et les chambres d'incubation sont remplies avec une solution contenant ou non l'enzyme *PstI* dans son tampon enzymatique. Une incubation de 1 h à 37 °C est alors réalisée puis la lame est lavée, séchée, lue et quantifiée selon le protocole décrit précédemment.

Dans le cas où cette activité est mesurée dans un extrait cellulaire, nous utilisons un cache d'épaisseur plus importante (Arrayit). Ceci nous permet d'augmenter le volume de réaction, dans ce cas 100 µL, nécessaire pour contenir 200 µg d'extrait (HeLa S3 à 4,5 µg/mL et HeLa MR à 5 µg/mL). Les lames sont ainsi incubées 1h30 à 37 °C en présence des extraits avant d'être lavées, séchées et lues. Un nouveau cache adhésif (volume d'environ 17 µL) est ensuite à nouveau placé sur les lames. Les chambres d'incubation sont remplies avec du tampon d'hybridation 1 M et les lames placées 1 h dans une étuve à 50 °C. Elles sont ensuite lavées et séchées, puis un autre cache est placé et chaque bloc des lames est incubé avec une solution contenant ou non l'enzyme *PstI* dans son tampon enzymatique, pendant 1 h à 37 °C. Les lames sont finalement lavées, séchées, lues et quantifiées comme précédemment.

5.4.7 Détermination de la densité des lames

Nous réalisons tout d'abord une courbe de calibration représentant l'intensité de fluorescence mesurée en fonction de la quantité de sonde déposée. Pour cela, nous déposons manuellement 0,5 µL des solutions contenant la sonde HP PstI à différentes concentrations (1 µM, 2 µM, 5 µM, 8 µM, 10 µM) diluées dans de l'eau milliQ. Nous laissons alors les spots sécher à température ambiante. Une fois secs, ces derniers sont quantifiés par fluorescence ce qui nous permet de tracer la courbe de calibration avec en abscisse la quantité de sonde déposée et en ordonnée la fluorescence correspondante.

Sur une autre lame, nous déposons manuellement 0,5 µL des solutions de sonde aux mêmes concentrations mais dans les conditions d'immobilisation standard, c'est-à-dire en présence de cuivre (5 eq) et de DIPEA (25 eq). La réaction est réalisée pendant une nuit puis la lame est lavée et lue (au même gain que la lame servant à la courbe de calibration, dans notre cas 150). La fluorescence lue correspond ainsi aux sondes covalamment greffées. En se servant de la courbe de calibration nous pouvons ainsi établir la quantité, en pmoles, de sondes greffées.

Nous déterminons alors la densité de sondes en utilisant la formule suivante où N_a est le nombre d'Avogadro ($6,02214 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) :

$$\text{Densité (molécules/cm}^2\text{)} = \frac{\text{sondes}_{\text{greffées}}(\text{pmoles}) \times N_a \times 10^{-4}}{\pi \times (\text{rayon } (\mu\text{m}))^2} \quad (5.1)$$

5.5 Enzymes et tampons enzymatiques utilisés

Le tableau (5.4) récapitule l'ensemble des enzymes et extraits cellulaires utilisés au cours des diverses manipulations enzymatiques.

5.6 Préparation d'un extrait nucléaire à partir de cellules

Les extraits sont préparés à partir de cellules congelées à -80 °C. Tout d'abord, les cellules sont décongelées et centrifugées 5 min à 500 g. Elles sont reprises dans 1 mL de PBS, afin de les rincer, puis centrifugées à nouveau 5 min à 500 g. Le culot de cellules est repris à froid dans du tampon de lyse A (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,02 % Triton X-100, 0,5 mM DTT, 18 µg/mL PMSF ; 500 µL de tampon de lyse A par tranche de 10⁶ cellules), puis sont placées 20 min sur de la glace. Les cellules sont ensuite vortexées 30 s afin de faciliter la lyse de la membrane cytoplasmique. La lyse est vérifiée au bleu de trypan. Pour cela on prélève 1 µL d'extrait que l'on mélange à 9 µL de bleu de trypan et on regarde la coloration des cellules sous microscope. Si celles-ci sont colorées cela signifie que la lyse a fonctionné. Une fois la lyse vérifiée, les noyaux sont culottés par centrifugation de la solution 5 min à 2300 g à 4 °C. Les protéines cytoplasmiques se trouvent alors dans le surnageant qui est éliminé. Les noyaux sont repris dans du tampon de lyse B (10 mM HEPES pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 400 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 25 % glycérol, 0,5 mM DTT, 18 µg/mL PMSF, 0,7 X antiprotéase (Roche Diagnostics) ; 12,5 µl / million de cellules). Les noyaux sont ainsi incubés 20 min sur de la glace. Pour faciliter la lyse des noyaux, deux cycles de congélation (30 s dans l'azote liquide) - décongélation (5 min à 4 °C) sont réalisés. Finalement la solution est centrifugée 10 min à 16000 g ce qui permet de séparer les débris membranaires des protéines nucléaires contenues dans le surnageant. Le lysat

Enzyme/extrait	Source (com- merciale...)	Concentration	Tampon utilisé (1X)
<i>Pst</i> I	Invitrogen	10 U/ μ L	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl
<i>Eco</i> RI	Invitrogen	10 U/ μ L	50 mM Tris-HCl pH 8 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
Fpg	New England Biolabs	8 U/ μ L	10 mM bis Tris propane-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT pH=7.0
Apel	Trevigen	2,5 U/ μ L	10 mM HEPES-KOH 100 mM KCl 10 mM MgCl ₂ pH 7.4
UNG	Sigma et New England Biolabs	1 U/ μ L et 5 U/ μ L	50 mM HEPES 50 mM KCl 0,25 % TritonX-100 10 μ g/mL BSA pH 7.5
hAag	Trevigen	10 U/ μ L	10 mM KCl 10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM Tris-HCl 2 mM MgSO ₄ 0,1 % Triton X-100 pH 8.8
MGMT	Alexis	100 U/ μ L	50 mM HEPES 50 mM KCl 0,25 % Triton X-100 10 μ g/mL BSA pH 7.5
extrait nucléaire HeLa	Cilbiotech	10 ou 9 μ g/mL selon le lot	10 mM HEPES/KOH pH 7,8 2 mM EGTA/KOH pH 7,8 80 mM KCl 0,1 mM ZnCl ₂ 1 mM DTT 0,5 μ g/mL BSA
extrait nucléaire U373	Cellules fournies par Dr L. Pelletier	2,75 μ g/mL	
extrait nucléaire U373-IV3		3,01 μ g/mL	
extrait nucléaire U373-IV3-TMZ		2,8 μ g/mL	
extrait total HeLa S3	Pr B. Kaina	4,5 μ g/mL	Tampon enzymatique de la MGMT
extrait total HeLa MR	Pr B. Kaina	5 μ g/mL	

Tableau 5.4 – Tableau récapitulatif des enzymes, extraits cellulaires et tampons enzymatiques utilisés

nucléaire ainsi obtenu est aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à utilisation. 2 μL sont prélevés et ajoutés à 318 μL d'eau milliQ pour le dosage.

Le dosage des protéines de l'extrait est réalisé par la méthode de l'acide bicinchonique du kit BCA (Interchim).

5.7 Protocoles liés aux analyses par RPE pulsée

5.7.1 Marquage des sondes par des nitroxydes par chimie click

La réaction de chimie click est réalisée en faisant réagir une quantité d'oligonucléotide alcyne avec 25 eq de DIPEA (solution à 50 mM), 5 eq de CuI (solution à 10 mM) et un excès d'azido-TEMPO (solution diluée dans du DMSO). La solution est placée une nuit à 37°C sous légère agitation (600 rpm). Typiquement, pour 30 nmoles d'oligonucléotide alcyne nous utilisons environ 1 μmole d'azido-tempo dans un volume de réaction de 140 μL (tableau (5.5)). Afin de s'assurer que la réaction est complète, une fraction du mélange réactionnel est analysée par HPLC analytique (colonne C18, 300 Å, gradient AcN/TEAA 4-16 % en 42 min, débit 1 mL/min). Le volume est ensuite complété à 500 μL avec de l'eau milliQ et le mélange réactionnel est dessalé sur une colonne d'exclusion NAP-5. Après addition de TEAA (concentration finale de 10 mM) au sein de l'échantillon dessalé, celui-ci est purifié par HPLC sur un système analytique (colonne C18, gradient AcN/TEAA 4-16 % en 42 min, débit 1 mL/min). L'oligonucléotide bi-marqué ainsi purifié est lyophilisé puis repris dans de l'eau milliQ et contrôlé par HPLC analytique et par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Pour le brin d'ADN mono-marqué utilisé dans le système en "triangle", le protocole utilisé est identique à celui décrit pour les oligonucléotides bi-marqués.

Oligonucléotide alcyne	30 nmoles
DIPEA (50 mM)	15 μL
CuI (10 mM)	15 μL
Azido-tempo (0,5 M)	2 μL

Tableau 5.5 – Conditions de réactions classiquement utilisées pour le bi-marquage par chimie click des sondes oligonucléotidiques pour les analyses de RPE

5.7.2 Mesures des températures de fusion

Une solution de duplex contenant 1 μg de chaque brin d'ADN dans 55 μL de tampon d'hybridation (400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl_2 , pH 7,4), complété à 200 μL avec de l'eau milliQ. La solution est alors portée à 90°C pendant deux minutes avant d'être redescendue progressivement à température ambiante.

Une cuve de spectromètre est ensuite remplie avec la solution à analyser avant d'être placée dans un spectromètre UV-visible (8453 UV-visible Spectrophotometer Agilent). L'absorbance à 260 nm de la solution est mesurée toutes les minutes en réalisant une rampe de température de

20 °C à 70 °C (incrément de 0,5 °C/min). La température de fusion est déterminée à partir de la courbe obtenue à l'aide du logiciel UV-visible Chemstation.

5.7.3 Préparation des échantillons pour les analyses en RPE pulsée

Dans un premier temps, 3 nmoles de brin bi-marqué et un excès de brin complémentaire (1,5 ou 2,2 équivalents selon les expériences) sont placés dans un eppendorf. La solution est alors évaporée au speed-vac. 18 μ L d'un tampon (400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl₂, pH 7,4) sont ajoutés et complétés avec 42 μ L d'eau milliQ. La solution est alors chauffée à 90°C pendant 2 min puis redescendue progressivement à température ambiante (hybridation des deux brins). La solution est séchée au speed-vac. 45 μ L de D₂O et 15 μ L de glycérol deutéré sont ajoutés puis la solution est transférée dans un tube RPE et congelée dans de l'azote liquide. L'échantillon est conservé ainsi jusqu'à l'analyse par RPE pulsée.

5.7.4 Détermination des distances par RPE pulsée

Les mesures par RPE pulsée sont réalisées par G. Sicoli ou V. Maurel du laboratoire de Résonance Magnétique du CEA-grenoble (DSM/INAC/SCIB/LRM). Ces mesures sont effectuées à 60-70 K sur un spectromètre Bruker ELEXSYS E580 (Bruker). La séquence utilisée pour toutes les expériences de RPE pulsée est la séquence DEER (double electron electron resonance) à 4 pulses (figure (5.2)) [Jeschke et Polyhach, 2007]. La fréquence d'observation utilisée est de 75 MHz. Les mesures ont été accumulées sur une nuit.

La détermination de la distribution de distances est réalisée par l'intermédiaire du programme DeerAnalysis2006-07 faisant appel à la régularisation de Tikhonov [Jeschke *et al.*, 2006a].

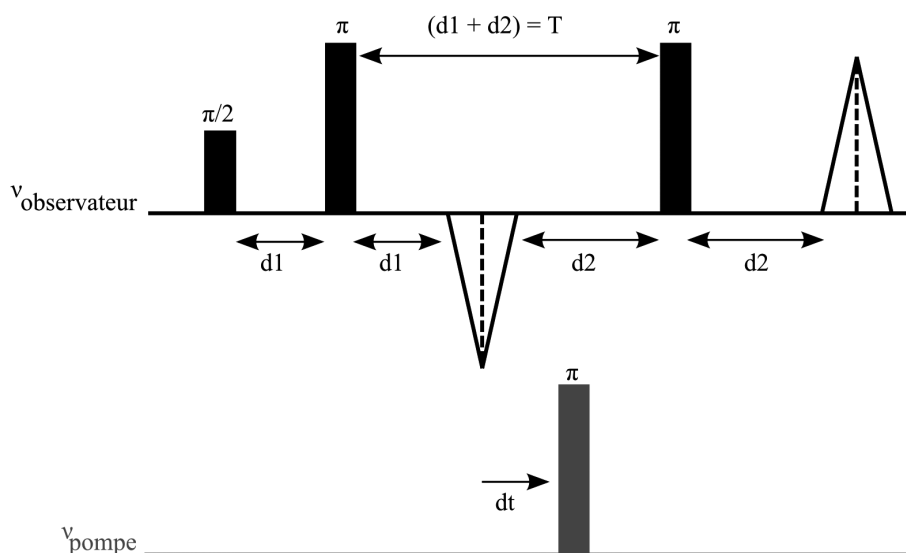


Figure 5.2 – Séquence DEER à 4 pulses utilisée pour la détermination des distances par RPE pulsée

5.7.5 Préparation des oligonucléotides contenant les lésions platinées

L'oligonucléotide non-lésé (typiquement 100 nmoles) est mis à réagir pendant une nuit avec une solution de cisplatine (7,5 eq, Merck) ou d'oxaliplatine (aussi appelé Eloxatine, 7,5 eq,

Sanofi-Aventis) dans un volume de 200 μL . Les mélanges réactionnels obtenus sont ensuite purifiés par chromatographie HPLC analytique (colonne C18, 300 Å, 250x4,6 mm, gradient AcN/TEAA 10 mM 5-12 %, débit 1 mL/min). Les oligonucléotides ainsi obtenus sont analysés par HPLC analytique et par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5.7.6 Digestion par les exonucléases des oligonucléotides contenant les lésions platinées

Digestion par la Phosphodiesterase I (Crotalus venom) 3'→5'

200 pmoles de chaque oligonucléotide sont séchés et repris dans 15,5 μL d'eau milliQ et 4 μL de tampon citrate d'ammonium 500 mM (pH 5). On ajoute 0,5 μL de phosphodiesterase I à 0,03 U/ μL (Sigma-aldrich), et la solution est incubée à 37 °C. On réalise, à des temps donnés, des prélèvements de 1 μL auxquels on ajoute 9 μL d'eau milliQ. 1 μL de la solution est alors déposée sur la cible pour analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Digestion par la Phosphodiesterase II (Bovine Spleen) 5'→3'

200 pmoles de chaque oligonucléotide sont séchées et reprises dans 15 μL d'eau milliQ et 4 μL de tampon citrate d'ammonium 500 mM (pH 5). On rajoute alors 1 μL de phosphodiesterase II à 0,01 U/ μL (Sigma-aldrich), et la solution est incubée à 37 °C. On réalise, à des temps donnés, des prélèvements de 1 μL auxquels on ajoute 9 μL d'eau milliQ. 1 μL de la solution est alors déposée sur la cible pour analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

5.7.7 Préparation des sondes nucléiques duplex "tri-marquées"

Préparation du duplex tri-marqué

La préparation du duplex est similaire à celle précédemment décrite (paragraphe 5.7.3 page précédente) en remplaçant le tampon par celui de l'enzyme EndoIV (Trevigen, concentration finale : 10 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 100 mM KCl). Pour cela, 3 nmoles de brin bi-marqué et placé en mélange avec 1,5 eq de brin mono-marqué complémentaire. Le tout est alors séché au speed-vac et repris par 6 μL de tampon 10 X de EndoIV et 54 μL d'eau milliQ. La solution est alors chauffée à 90 °C pendant 2 min puis redescendue progressivement à température ambiante (hybridation des deux brins).

Préparation de l'échantillon pour la mesure par RPE pulsée

Une fois le duplex réalisé, la solution est évaporée au speed-vac puis reprise par 45 μL de D₂O et 15 μL de glycérol deutéré. L'échantillon est alors transféré dans un tube RPE et analysé.

Préparation de l'échantillon pour la détection de l'activité de coupure de l'EndoIV par RPE pulsée

Une fois le duplex réalisé dans le tampon de l'enzyme (60 μL), nous ajoutons 5 μL de la protéine EndoIV à 1 U/ μL (Trevigen) et le mélange réactionnel est incubé 1 h à 37 °C. La solution est alors réduite à environ 2-3 μL au speed-vac (sans chauffage), avant d'ajouter 45 μL

de D₂O et 15 μ L de glycérol deutéré. L'échantillon est alors transféré dans un tube RPE et analysé.

Bibliographie

- [Abbotts et Madhusudan, 2010] ABBOTTS, R. et MADHUSUDAN, S. (2010). Human AP endonuclease 1 (APE1) : from mechanistic insights to druggable target in cancer. *Cancer Treat Rev*, 36(5):425–435.
- [Adhikari *et al.*, 2006] ADHIKARI, S., TORETSKY, J. A., YUAN, L. et ROY, R. (2006). Magnesium, essential for base excision repair enzymes, inhibits substrate binding of n-methylpurine-dna glycosylase. *J Biol Chem*, 281(40):29525–29532.
- [Adhikari *et al.*, 2007] ADHIKARI, S., UREN, A. et ROY, R. (2007). N-terminal extension of N-methylpurine DNA glycosylase is required for turnover in hypoxanthine excision reaction. *J Biol Chem*, 282(41):30078–30084.
- [Al-Attar *et al.*, 2010] AL-ATTAR, A., GOSSAGE, L., FAREED, K. R., SHEHATA, M., MOHAMMED, M., ZAITOUN, A. M., SOOMRO, I., LOBO, D. N., ABBOTTS, R., CHAN, S. et MADHUSUDAN, S. (2010). Human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreato-biliary cancers. *Br J Cancer*, 102(4):704–709.
- [Al-Tassan *et al.*, 2002] AL-TASSAN, N., CHMIEL, N. H., MAYNARD, J., FLEMING, N., LIVINGSTON, A. L., WILLIAMS, G. T., HODGES, A. K., DAVIES, D. R., DAVID, S. S., SAMPSON, J. R. et CHEADLE, J. P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G : C->T : A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, 30(2):227–232.
- [Almeida et Sobol, 2007] ALMEIDA, K. H. et SOBOL, R. W. (2007). A unified view of base excision repair : lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)*, 6(6):695–711.
- [Alvino *et al.*, 2006] ALVINO, E., CASTIGLIA, D., CAPORALI, S., PEPPONI, R., CAPORASO, P., LACAL, P. M., MARRA, G., FISCHER, F., ZAMBRUNO, G., BONMASSAR, E., JIRICNY, J. et D’ATRI, S. (2006). A single cycle of treatment with temozolomide, alone or combined with O6-benzylguanine, induces strong chemoresistance in melanoma cell clones in vitro : role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and the mismatch repair system. *Int J Oncol*, 29(4):785–797.
- [An *et al.*, 2005] AN, Q., ROBINS, P., LINDAHL, T. et BARNES, D. E. (2005). C-> T mutagenesis and gamma-radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases. *Embo Journal*, 24(12):2205–2213.
- [Anthony *et al.*, 2009] ANTHONY, S. P., ROSEN, L. S., WEISS, G. J., GORDON, M. S., ADAMS, B. J., GERSON, S. L., ALVAREZ, D., THEUER, C. P. et LEIGH, B. R. (2009). A phase I study of daily oral TRC102 (methoxyamine) to enhance the therapeutic effects of pemetrexed in patients with advanced refractory cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)*, 27:2552.

- [Avery *et al.*, 1944] AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. et MCCARTY, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med*, 79(2):137–158.
- [Ayadi *et al.*, 1999] AYADI, L., COULOMBEAU, C. et LAVERY, R. (1999). Abasic sites in duplex DNA : Molecular modeling of sequence-dependent effects on conformation. *Biophysical Journal*, 77(6):3218–3226.
- [Ayi *et al.*, 1992] AYI, T. C., LOH, K. C., ALI, R. B. et LI, B. F. (1992). Intracellular localization of human DNA repair enzyme methylguanine-DNA methyltransferase by antibodies and its importance. *Cancer Res*, 52(23):6423–6430.
- [Azqueta *et al.*, 2009] AZQUETA, A., LORENZO, Y. et COLLINS, A. R. (2009). In vitro comet assay for DNA repair : a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis*, 24(4):379–381.
- [Baldwin et O'Brien, 2009] BALDWIN, M. R. et O'BRIEN, P. J. (2009). Human AP-endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry*, 48(25):6022–6033.
- [Barhate *et al.*, 2007] BARHATE, N., CEKAN, P., MASSEY, A. P. et SIGURDSSON, S. T. (2007). A nucleoside that contains a rigid nitroxide spin label : a fluorophore in disguise. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(15):2655–2658.
- [Barker *et al.*, 2005] BARKER, S., WEINFELD, M. et MURRAY, D. (2005). DNA-protein cross-links : their induction, repair, and biological consequences. *Mutation Research-Reviews In Mutation Research*, 589(2):111–135.
- [Beaucage et Iyer, 1992] BEAUCAGE, S. L. et IYER, R. P. (1992). Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Tetrahedron*, 48(12):2223 – 2311.
- [Beier et Hoheisel, 1999] BEIER, M. et HOHEISEL, J. D. (1999). Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res*, 27(9):1970–1977.
- [Belanich *et al.*, 1996] BELANICH, M., RANDALL, T., PASTOR, M. A., KIBITEL, J. T., ALAS, L. G., DOLAN, M. E., SCHOLD, S. C., GANDER, M., LEJEUNE, F. J., LI, B. F., WHITE, A. B., WASSERMAN, P., CITRON, M. L. et YAROSH, D. B. (1996). Intracellular localization and intercellular heterogeneity of the human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 37(6):547–555.
- [Belon et Frick, 2008] BELON, C. A. et FRICK, D. N. (2008). Monitoring helicase activity with molecular beacons. *Biotechniques*, 45(4):433–40, 442.
- [Bennett et Mosbaugh, 1992] BENNETT, S. E. et MOSBAUGH, D. W. (1992). Characterization of the Escherichia coli uracil-DNA glycosylase.inhibitor protein complex. *J Biol Chem*, 267(31):22512–22521.
- [Bennett *et al.*, 1993] BENNETT, S. E., SCHIMERLIK, M. I. et MOSBAUGH, D. W. (1993). Kinetics of the uracil-DNA glycosylase inhibitor protein association - Ung interaction with Ugi, nucleic-acids, and uracil compounds. *Journal Of Biological Chemistry*, 268(36):26879–26885.
- [Benters *et al.*, 2002] BENTERS, R., NIEMEYER, C. M., DRUTSCHMANN, D., BLOHM, D. et WÖHRLE, D. (2002). DNA microarrays with PAMAM dendritic linker systems. *Nucleic Acids Res*, 30(2):E10.

- [Bier *et al.*, 2008] BIER, F. E., von NICKISCH-ROSENEGK, M., EHRENTREICH-FORSTER, E., REISS, E., HENKEL, J., STREHLOW, R. et ANDRESEN, D. (2008). DNA microarrays. *Bio-sensing For The 21st Century*, 109:433–453.
- [Bjelland et Seeberg, 2003] BJELLAND, S. et SEEBERG, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*, 531(1-2):37–80.
- [Borbat *et al.*, 2002] BORBAT, P. P., MCHAUURAB, H. S. et FREED, J. H. (2002). Protein structure determination using long-distance constraints from double-quantum coherence ESR : study of T4 lysozyme. *J Am Chem Soc*, 124(19):5304–5314.
- [Bouillon *et al.*, 2006] BOUILLON, C., MEYER, A., VIDAL, S., JOCHUM, A., CHEVOLOT, Y., CLOAREC, J. P., PRALY, J. P., VASSEUR, J. J. et MORVAN, F. (2006). Microwave assisted "click" chemistry for the synthesis of multiple labeled-carbohydrate oligonucleotides on solid support. *Journal Of Organic Chemistry*, 71(12):4700–4702.
- [Bowman *et al.*, 2010] BOWMAN, A., WARD, R., EL-MKAMI, H., OWEN-HUGHES, T. et NORMAN, D. G. (2010). Probing the (H3-H4) 2 histone tetramer structure using pulsed EPR spectroscopy combined with site-directed spin labelling. *Nucleic Acids Res*, 38(2):695–707.
- [Bramson *et al.*, 1995] BRAMSON, J., O'CONNOR, T. et PANASCIR, L. (1995). Effect of alkyl-N-purine DNA glycosylase overexpression on cellular resistance to bifunctional alkylating agents. *Biochem Pharmacol*, 50(1k):39–44.
- [Brell *et al.*, 2005] BRELL, M., TORTOSA, A., VERGER, E., GIL, J. M., VIÑOLAS, N., VILLÁ, S., ACEBES, J. J., CARAL, L., PUJOL, T., FERRER, I., RIBALTA, T. et GRAUS, F. (2005). Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res*, 11(14):5167–5174.
- [Bruner *et al.*, 2000] BRUNER, S. D., NORMAN, D. P. et VERDINE, G. L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403(6772):859–866.
- [Cadet *et al.*, 1998] CADET, J., D'HAM, C., DOUKI, T., POUGET, J. P., RAVANAT, J. L. et SAUVAIGO, S. (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic Res*, 29(6):541–550.
- [Cadet *et al.*, 2003] CADET, J., DOUKI, T., GASPARUTTO, D. et RAVANAT, J. L. (2003). Oxidative damage to DNA : formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 531(1-2):5–23.
- [Caldecott, 2008] CALDECOTT, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 9(8):619–631.
- [Calléja *et al.*, 1999] CALLÉJA, F., JANSEN, J. G., VRIELING, H., LAVAL, F. et van ZEELAND, A. A. (1999). Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase. *Mutat Res*, 425(2):185–194.
- [Campalans *et al.*, 2007] CAMPALANS, A., AMOUROUX, R., BRAVARD, A., EPE, B. et RADICELLA, J. P. (2007). UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J Cell Sci*, 120(Pt 1):23–32.

- [Castaing *et al.*, 1993] CASTAING, B., GEIGER, A., SELIGER, H., NEHLS, P., LAVAL, J., ZELWER, C. et BOITEUX, S. (1993). Cleavage and binding of a DNA fragment containing a single 8-oxoguanine by wild type and mutant FPG proteins. *Nucleic Acids Res*, 21(12):2899–2905.
- [Cekan *et al.*, 2008] CEKAN, P., SMITH, A. L., BARHATE, N., ROBINSON, B. H. et SIGURDSSON, S. T. (2008). Rigid spin-labeled nucleoside C : a nonperturbing EPR probe of nucleic acid conformation. *Nucleic Acids Res*, 36(18):5946–5954.
- [Chaney *et al.*, 2005] CHANEY, S. G., CAMPBELL, S. L., BASSETT, E. et WU, Y. B. (2005). Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews In Oncology Hematology*, 53(1):3–11.
- [Chargaff, 1951] CHARGAFF, E. (1951). Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed Proc*, 10(3):654–659.
- [Chargaff et Vischer, 1949] CHARGAFF, E. et VISCHER, E. (1949). The composition of the deoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. *J Biol Chem*, 177(1):405–416.
- [Chen et Stubbe, 2005] CHEN, J. et STUBBE, J. (2005). Bleomycins : towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 5(2):102–112.
- [Chetsanga *et al.*, 1981] CHETSANGA, C. J., LOZON, M., MAKAROFF, C. et SAVAGE, L. (1981). Purification and characterization of escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase that excises damaged 7-methylguanine from deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 20(18):5201–5207.
- [Chevry, 2007] CHEVRY, A. (2007). Rapport de stage de master2 : "Mise au point de sondes nucléiques fluorescentes pour l'analyse d'activité de réparation de l'ADN par l'alkyle guanine transférase AGT".
- [Chiang *et al.*, 2005] CHIANG, Y.-W., BORBAT, P. P. et FREED, J. H. (2005). The determination of pair distance distributions by pulsed ESR using Tikhonov regularization. *J Magn Reson*, 172(2):279–295.
- [Chollat-Namy, 2006] CHOLLAT-NAMY, A. (2006). *Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence*. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier.
- [Chollat-Namy *et al.*, 2005] CHOLLAT-NAMY, A., GASPARUTTO, D., CADET, J. et FAVIER, A. (2005). Nucleic acid biosensors for real-time monitoring of DNA repair activities by FRET. *Chemistry of Nucleic Acid Components*, 7:397–399.
- [Chou et Cheng, 2002] CHOU, K.-M. et CHENG, Y.-C. (2002). An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA. *Nature*, 415(6872):655–659.
- [Chou et Cheng, 2003] CHOU, K.-M. et CHENG, Y.-C. (2003). The exonuclease activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1). biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp4G. *J Biol Chem*, 278(20):18289–18296.
- [Chrissey *et al.*, 1996] CHRISSEY, L. A., LEE, G. U. et O'FERRALL, C. E. (1996). Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Res*, 24(15):3031–3039.
- [Cline et Hanawalt, 2003] CLINE, S. D. et HANAWALT, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5):361–372.

- [Collins, 2004] COLLINS, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair : principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 26(3):249–261.
- [Collins, 2009] COLLINS, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res*, 681(1):24–32.
- [Collman *et al.*, 2004] COLLMAN, J. P., DEVARAJ, N. K. et CHIDSEY, C. E. D. (2004). "clicking" functionality onto electrode surfaces. *Langmuir*, 20(4):1051–1053.
- [Corne *et al.*, 2008] CORNE, C., FICHE, J.-B., GASPARUTTO, D., CUNIN, V., SURANITI, E., BUHOT, A., FUCHS, J., CALEMCHUK, R., LIVACHE, T. et FAVIER, A. (2008). SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes. *Analyst*, 133(8):1036–1045.
- [Cromie *et al.*, 2001] CROMIE, G. A., CONNELLY, J. C. et LEACH, D. R. (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends : conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*, 8(6):1163–1174.
- [Csáki *et al.*, 2001] CSÁKI, A., MÖLLER, R., STRAUBE, W., KÖHLER, J. M. et FRITZSCHE, W. (2001). DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Res*, 29(16):E81.
- [Cuniasse *et al.*, 1990] CUNIASSE, P., FAZAKERLEY, G. V., GUSCHLBAUER, W., KAPLAN, B. E. et SOWERS, L. C. (1990). The abasic site as a challenge to DNA polymerase. A nuclear magnetic resonance study of G, C and T opposite a model abasic site. *J Mol Biol*, 213(2):303–314.
- [Dabholkar *et al.*, 1992] DABHOLKAR, M., BRADSHAW, L., PARKER, R. J., GILL, I., BOSTICK-BRUTON, F., MUGGIA, F. M. et REED, E. (1992). Cisplatin-DNA damage and repair in peripheral blood leukocytes in vivo and in vitro. *Environ Health Perspect*, 98:53–59.
- [Dahm, 2008] DAHM, R. (2008). Discovering DNA : Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet*, 122(6):565–581.
- [Darwanto *et al.*, 2009] DARWANTO, A., FARREL, A., ROGSTAD, D. K. et SOWERS, L. C. (2009). Characterization of DNA glycosylase activity by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem*, 394(1):13–23.
- [D'Atri *et al.*, 1998] D'ATRI, S., TENTORI, L., LACAL, P. M., GRAZIANI, G., PAGANI, E., BENINCASA, E., ZAMBRUNO, G., BONMASSAR, E. et JIRICNY, J. (1998). Involvement of the mismatch repair system in temozolomide-induced apoptosis. *Mol Pharmacol*, 54(2):334–341.
- [Dawson *et al.*, 2005] DAWSON, E. D., REPPERT, A. E., ROWLEN, K. L. et KUCK, L. R. (2005). Spotting optimization for oligo microarrays on aldehyde-glass. *Anal Biochem*, 341(2):352–360.
- [Deegan *et al.*, 1997] DEEGAN, R. D., BAKAJIN, O., DUPONT, T. F., HUBER, G., NAGEL, S. R. et WITTEN, T. A. (1997). Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, 389(6653):827–829.
- [Demers *et al.*, 2000] DEMERS, L. M., MIRKIN, C. A., MUCIC, R. C., REYNOLDS, R. A., LETSINGER, R. L., ELGHANIAN, R. et VISWANADHAM, G. (2000). A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 72(22):5535–5541.

- [Devaraj *et al.*, 2005] DEVARAJ, N. K., MILLER, G. P., EBINA, W., KAKARADOV, B., COLLMAN, J. P., KOOL, E. T. et CHIDSEY, C. E. D. (2005). Chemoselective covalent coupling of oligonucleotide probes to self-assembled monolayers. *J Am Chem Soc*, 127(24):8600–8601.
- [Dietrich *et al.*, 2002] DIETRICH, A., BUSCHMANN, V., MÜLLER, C. et SAUER, M. (2002). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor-acceptor substituted DNA strands : a comparative study of ensemble and single-molecule data. *J Biotechnol*, 82(3):211–231.
- [Dolan *et al.*, 1990] DOLAN, M. E., MOSCHEL, R. C. et PEGG, A. E. (1990). Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(14):5368–5372.
- [Drabløs *et al.*, 2004] DRABLØS, F., FEYZI, E., AAS, P. A., VAAGBØ, C. B., KAVLI, B., BRATLIE, M. S., PEÑA-DÍAZ, J., OTTERLEI, M., SLUPPHAUG, G. et KROKAN, H. E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)*, 3(11):1389–1407.
- [Du *et al.*, 2005] DU, H., STROHSAHL, C. M., CAMERA, J., MILLER, B. L. et KRAUSS, T. D. (2005). Sensitivity and specificity of metal surface-immobilized "molecular beacon" biosensors. *J Am Chem Soc*, 127(21):7932–7940.
- [Dufva, 2005] DUFVA, M. (2005). Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng*, 22(5-6):173–184.
- [Dunham *et al.*, 1998] DUNHAM, S. U., DUNHAM, S. U., TURNER, C. J. et LIPPARD, S. J. (1998). Solution structure of a DNA duplex containing a nitroxide spin-labeled platinum d(GpG) intrastrand cross-link refined with NMR-derived long-range electron-proton distance restraints. *Journal Of The American Chemical Society*, 120(22):5395–5406.
- [Dyrkheeva *et al.*, 2007] DYRKHEEVA, N. S., KHODYREVA, S. N. et LAVRIK, O. I. (2007). Multifunctional human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 : the role of additional functions. *Mol Biol (Mosk)*, 41(3):450–466.
- [Eccles *et al.*, 2010] ECCLES, L. J., LOMAX, M. E. et O'NEILL, P. (2010). Hierarchy of lesion processing governs the repair, double-strand break formation and mutability of three-lesion clustered dna damage. *Nucleic Acids Res*, 38(4):1123–1134.
- [Edwards *et al.*, 2001] EDWARDS, T. E., OKONOGI, T. M., ROBINSON, B. H. et SIGURDSSON, S. T. (2001). Site-specific incorporation of nitroxide spin-labels into internal sites of the TAR RNA ; structure-dependent dynamics of RNA by EPR spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 123(7):1527–1528.
- [El-Sagheer et Brown, 2010] EL-SAGHEER, A. H. et BROWN, T. (2010). Click chemistry with DNA. *Chem Soc Rev*, 39(4):1388–1405.
- [Engelward *et al.*, 1997] ENGELWARD, B. P., WEEDA, G., WYATT, M. D., BROEKHOF, J. L., de WIT, J., DONKER, I., ALLAN, J. M., GOLD, B., HOEIJMAKERS, J. H. et SAMSON, L. D. (1997). Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(24):13087–13092.

- [Esteller *et al.*, 2000] ESTELLER, M., GARCIA-FONCILLAS, J., ANDION, E., GOODMAN, S. N., HIDALGO, O. F., VANACLOCHA, V., BAYLIN, S. B. et HERMAN, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*, 343(19):1350–1354.
- [Evans *et al.*, 2000] EVANS, A. R., LIMP-FOSTER, M. et KELLEY, M. R. (2000). Going APE over ref-1. *Mutat Res*, 461(2):83–108.
- [Fang *et al.*, 1999] FANG, X. H., LIU, X. J., SCHUSTER, S. et TAN, W. H. (1999). Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies. *Journal Of The American Chemical Society*, 121(12):2921–2922.
- [Fazio *et al.*, 2002] FAZIO, F., BRYAN, M. C., BLIXT, O., PAULSON, J. C. et WONG, C.-H. (2002). Synthesis of sugar arrays in microtiter plate. *J Am Chem Soc*, 124(48):14397–14402.
- [Fischer *et al.*, 2006] FISCHER, J. A., MULLER-WEEKS, S. et CARADONNA, S. J. (2006). Fluorodeoxyuridine modulates cellular expression of the DNA base excision repair enzyme uracil-DNA glycosylase. *Cancer Research*, 66(17):8829–8837.
- [Fishel et Kelley, 2007] FISHEL, M. L. et KELLEY, M. R. (2007). The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med*, 28(3-4):375–395.
- [Fixe *et al.*, 2004] FIXE, F., DUFVA, M., TELLEMAN, P. et CHRISTENSEN, C. B. V. (2004). Functionalization of poly(methylmethacrylate) (PMMA) as a substrate for DNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 32(1):e9.
- [Fodor *et al.*, 1991] FODOR, S. P., READ, J. L., PIRRUNG, M. C., STRYER, L., LU, A. T. et SOLAS, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 251(4995):767–773.
- [Fontecave, 2007] FONTECAVE, T. (2007). Rapport de stage de licence : "Incorporation de marqueurs RPE au sein d'oligonucléotides par chimie "click"".
- [Fortini *et al.*, 2003] FORTINI, P., PASCUCCI, B., PARLANTI, E., D'ERRICO, M., SIMONELLI, V. et DOGLIOTTI, E. (2003). 8-oxoguanine DNA damage : at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res*, 531(1-2):127–139.
- [Friedberg, 2006] FRIEDBERG, E. (2006). *DNA repair and mutagenesis*. 2ème édition.
- [Friedberg, 2003] FRIEDBERG, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921):436–440.
- [Friedberg et Lindahl, 2004] FRIEDBERG, E. C. et LINDAHL, T. (2004). Inroads into base excision repair ii. the discovery of DNA glycosylases. "An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues," *proc. nat. acad. sci. usa*, 1974. *DNA Repair (Amst)*, 3(11):1532–6 ; discussion 1531–2.
- [Fromme *et al.*, 2004] FROMME, J. C., BANERJEE, A. et VERDINE, G. L. (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol*, 14(1):43–49.
- [Fromme *et al.*, 2003] FROMME, J. C., BRUNER, S. D., YANG, W., KARPLUS, M. et VERDINE, G. L. (2003). Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nat Struct Biol*, 10(3):204–211.

- [Fromme et Verdine, 2003] FROMME, J. C. et VERDINE, G. L. (2003). DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J Biol Chem*, 278(51):51543–51548.
- [Fung et Demple, 2005] FUNG, H. et DEMPLE, B. (2005). A vital role for Ape1/Ref1 protein in repairing spontaneous DNA damage in human cells. *Mol Cell*, 17(3):463–470.
- [Gasparutto *et al.*, 2003] GASPARUTTO, D., SAINT-PIERRE, C., JAQUINOD, M., FAVIER, A. et CADET, J. (2003). MALDI-TOF mass spectrometry as a powerful tool to study enzymatic processing of DNA lesions inserted into oligonucleotides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 22(5-8):1583–1586.
- [Gasparutto, 2003] GASPARUTTO, D. et Cadet, J. (2003). Brevet fr2836926 : Substrat oligonucleotidique et procédé permettant d’analyser la présence d’activités de réparation des lésions de l’ADN.
- [Gierlich *et al.*, 2006] GIERLICH, J., BURLEY, G. A., GRAMLICH, P. M. E., HAMMOND, D. M. et CARELL, T. (2006). Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified dna. *Org Lett*, 8(17):3639–3642.
- [Goel *et al.*, 2005] GOEL, G., KUMAR, A., PUNIYA, A. K., CHEN, W. et SINGH, K. (2005). Molecular beacon : a multitask probe. *J Appl Microbiol*, 99(3):435–442.
- [Gong *et al.*, 2009] GONG, H., ZHONG, T., GAO, L., LI, X., BI, L. et KRAATZ, H.-B. (2009). Unlabeled hairpin DNA probe for electrochemical detection of single-nucleotide mismatches based on MutS-DNA interactions. *Anal Chem*.
- [Grant et Qin, 2007] GRANT, G. P. G. et QIN, P. Z. (2007). A facile method for attaching nitroxide spin labels at the 5’ terminus of nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 35(10):e77.
- [Green *et al.*, 1984] GREEN, C. L., LOECHLER, E. L., FOWLER, K. W. et ESSIGMANN, J. M. (1984). Construction and characterization of extrachromosomal probes for mutagenesis by carcinogens : site-specific incorporation of O6-methylguanine into viral and plasmid genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(1):13–17.
- [Gutmann *et al.*, 2004] GUTMANN, O., NIEKRAWIETZ, R., KUEHLEWEIN, R., STEINERT, C. P., REINBOLD, S., HEIJ, B. D., DAUB, M. et ZENGERLE, R. (2004). Non-contact production of oligonucleotide microarrays using the highly integrated TopSpot nanoliter dispenser. *Analyst*, 129(9):835–840.
- [Hamann *et al.*, 2009] HAMANN, I., SCHWERDTLE, T. et HARTWIG, A. (2009). Establishment of a non-radioactive cleavage assay to assess the DNA repair capacity towards oxidatively damaged DNA in subcellular and cellular systems and the impact of copper. *Mutat Res*, 669(1-2):122–130.
- [Hambley *et al.*, 1998] HAMBLEY, T. W., BERNERS-PRICE, S. J., DAVIES, M. S., DIAKOS, C. I., ER, H. M., FENTON, R. R., LING, E. C. et REZLER, E. M. (1998). Steric determinants of Pt/DNA interactions and anticancer activity. *Met Based Drugs*, 5(4):197–206.
- [Haushalter *et al.*, 1999] HAUSHALTER, K. A., STUKENBERG, M. W. T., KIRSCHNER, M. W. et VERDINE, G. L. (1999). Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol*, 9(4):174–185.
- [He *et al.*, 2000] HE, Q., OHNDORF, U. M. et LIPPARD, S. J. (2000). Intercalating residues determine the mode of HMG1 domains A and B binding to cisplatin-modified DNA. *Biochemistry*, 39(47):14426–14435.

- [Healey *et al.*, 1997] HEALEY, B. G., MATSON, R. S. et WALT, D. R. (1997). Fiberoptic DNA sensor array capable of detecting point mutations. *Anal Biochem*, 251(2):270–279.
- [Helleday *et al.*, 2008] HELLEDAY, T., PETERMANN, E., LUNDIN, C., HODGSON, B. et SHARMA, R. A. (2008). DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(3):193–204.
- [Hershey et Chase, 1952] HERSHEY, A. D. et CHASE, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 36(1):39–56.
- [Hickman et Samson, 1999] HICKMAN, M. J. et SAMSON, L. D. (1999). Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(19):10764–10769.
- [Hill *et al.*, 2001] HILL, J. W., HAZRA, T. K., IZUMI, T. et MITRA, S. (2001). Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease : potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res*, 29(2):430–438.
- [Hoeijmakers, 2001] HOEIJMAKERS, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835):366–374.
- [Hofer et Möller, 1998] HOFER, T. et MÖLLER, L. (1998). Reduction of oxidation during the preparation of DNA and analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol*, 11(8):882–887.
- [Horton *et al.*, 2000] HORTON, J. K., PRASAD, R., HOU, E. et WILSON, S. H. (2000). Protection against methylation-induced cytotoxicity by DNA polymerase beta-dependent long patch base excision repair. *J Biol Chem*, 275(3):2211–2218.
- [Hsieh et Yamane, 2008] HSIEH, P. et YAMANE, K. (2008). DNA mismatch repair : molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev*, 129(7-8):391–407.
- [Ide et Kotera, 2004] IDE, H. et KOTERA, M. (2004). Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull*, 27(4):480–485.
- [Ischenko et Saparbaev, 2002] ISCHENKO, A. A. et SAPARBAEV, M. K. (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415(6868):183–187.
- [Ishibashi *et al.*, 1994] ISHIBASHI, T., NAKABEPPU, Y., KAWATE, H., SAKUMI, K., HAYAKAWA, H. et SEKIGUCHI, M. (1994). Intracellular localization and function of DNA repair methyltransferase in human cells. *Mutat Res*, 315(3):199–212.
- [Jagtap et Szabó, 2005] JAGTAP, P. et SZABÓ, C. (2005). Poly(adp-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4(5):421–440.
- [Jakobsen *et al.*, 2010] JAKOBSEN, U., SHELKE, S. A., VOGEL, S. et SIGURDSSON, S. T. (2010). Site-directed spin-labeling of nucleic acids by click chemistry : Detection of abasic sites in duplex DNA by EPR spectroscopy. *J Am Chem Soc*.
- [Jeschke, 2002] JESCHKE, G. (2002). Distance measurements in the nanometer range by pulse EPR. *Chemphyschem*, 3(11):927–932.
- [Jeschke *et al.*, 2006a] JESCHKE, G., CHECHIK, V., IONITA, P., GODT, A., ZIMMERMANN, H., BANHAM, J., TIMMEL, C. R., HILGER, D. et JUNG, H. (2006a). DeerAnalysis2006 - a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data. *Applied Magnetic Resonance*, 30(3-4):473–498.

- [Jeschke et Polyhach, 2007] JESCHKE, G. et POLYHACH, Y. (2007). Distance measurements on spin-labelled biomacromolecules by pulsed electron paramagnetic resonance. *Phys Chem Chem Phys*, 9(16):1895–1910.
- [Jeschke *et al.*, 2009] JESCHKE, G., SAJID, M., SCHULTE, M. et GODT, A. (2009). Three-spin correlations in double electron-electron resonance. *Phys Chem Chem Phys*, 11(31):6580–6591.
- [Jeschke *et al.*, 2006b] JESCHKE, G., ZIMMERMANN, H. et GODT, A. (2006b). Isotope selection in distance measurements between nitroxides. *J Magn Reson*, 180(1):137–146.
- [Kaina *et al.*, 2007] KAINA, B., CHRISTMANN, M., NAUMANN, S. et ROOS, W. P. (2007). MGMT : key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*, 6(8):1079–1099.
- [Kaina *et al.*, 2004] KAINA, B., MÜHLHAUSEN, U., PIEE-STAFFA, A., CHRISTMANN, M., BOY, R. G., RÖSCH, F. et SCHIRRMACHER, R. (2004). Inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by glucose-conjugated inhibitors : comparison with nonconjugated inhibitors and effect on fotemustine and temozolomide-induced cell death. *J Pharmacol Exp Ther*, 311(2):585–593.
- [Kaina *et al.*, 1997] KAINA, B., ZIOUTA, A., OCHS, K. et COQUERELLE, T. (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells : facts and models. *Mutat Res*, 381(2):227–241.
- [Kan *et al.*, 1983] KAN, L. S., CHANDRASEGARAN, S., PULFORD, S. M. et MILLER, P. S. (1983). Detection of a guanine X adenine base pair in a decaoxyribonucleotide by proton magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(14):4263–4265.
- [Kartalou et Essigmann, 2001] KARTALOU, M. et ESSIGMANN, J. M. (2001). Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res*, 478(1-2):1–21.
- [Kato *et al.*, 2010] KATO, T., NATSUME, A., TODA, H., IWAMIZU, H., SUGITA, T., HACHISU, R., WATANABE, R., YUKI, K., MOTOMURA, K., BANKIEWICZ, K. et WAKABAYASHI, T. (2010). Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Ther*.
- [Kavli *et al.*, 2002] KAVLI, B., SUNDHEIM, O., AKBARI, M., OTTERLEI, M., NILSEN, H., SKORPEN, F., AAS, P. A., HAGEN, L., KROKAN, H. E. et SLUPPHAUG, G. (2002). hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U : A matches, U : G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem*, 277(42):39926–39936.
- [Kele *et al.*, 2009] KELE, P., MEZÖ, G., ACHATZ, D. et WOLFBEIS, O. S. (2009). Dual labeling of biomolecules by using click chemistry : a sequential approach. *Angew Chem Int Ed Engl*, 48(2):344–347.
- [Kelland, 2007] KELLAND, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8):573–584.
- [Kingma et Osheroff, 1998] KINGMA, P. S. et OSHEROFF, N. (1998). The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochim Biophys Acta*, 1400(1-3):223–232.

- [Kinsella, 2009] KINSELLA, T. J. (2009). Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. *Clin Cancer Res*, 15(6):1853–1859.
- [Klein et Oesch, 1992] KLEIN, S. et OESCH, F. (1992). Assay for O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase using oligonucleotides containing O6-methylguanine in a BamHI recognition site as substrate. *Anal Biochem*, 205(2):294–299.
- [Klungland et Bjelland, 2007] KLUNGLAND, A. et BJELLAND, S. (2007). Oxidative damage to purines in DNA : role of mammalian Ogg1. *DNA Repair (Amst)*, 6(4):481–488.
- [Kolb et al., 2001] KOLB, H. C., FINN, M. G. et SHARPLESS, K. B. (2001). Click chemistry : Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(11):2004–+.
- [Konishi et al., 2005] KONISHI, N., NAKAMURA, M., ISHIDA, E., SHIMADA, K., MITSUI, E., YOSHIIKAWA, R., YAMAMOTO, H. et TSUJIKAWA, K. (2005). High expression of a new marker PCA-1 in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res*, 11(14):5090–5097.
- [Koukourakis et al., 2001] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., KAKOLYRIS, S., SIVRIDIS, E., GEORGOULIAS, V., FUNTZILAS, G., HICKSON, I. D., GATTER, K. C. et HARRIS, A. L. (2001). Nuclear expression of human apurinic/apyrimidinic endonuclease (HAP1/Ref-1) in head-and-neck cancer is associated with resistance to chemoradiotherapy and poor outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 50(1):27–36.
- [Kowalczykowski, 2000] KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci*, 25(4):156–165.
- [Kreklaue et al., 2001] KREKLAU, E. L., LIMP-FOSTER, M., LIU, N., XU, Y., KELLEY, M. R. et ERICKSON, L. C. (2001). A novel fluorometric oligonucleotide assay to measure O(6)-methylguanine DNA methyltransferase, methylpurine DNA glycosylase, 8-oxoguanine DNA glycosylase and abasic endonuclease activities : DNA repair status in human breast carcinoma cells overexpressing methylpurine DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*, 29(12):2558–2566.
- [Krokan et Wittwer, 1981] KROKAN, H. et WITTWER, C. U. (1981). Uracil DNA-glycosylase from HeLa cells : general properties, substrate specificity and effect of uracil analogs. *Nucleic Acids Res*, 9(11):2599–2613.
- [Krokan et al., 2002] KROKAN, H. E., DRABLØS, F. et SLUPPHAUG, G. (2002). Uracil in DNA—occurrence, consequences and repair. *Oncogene*, 21(58):8935–8948.
- [Kunz et al., 2000] KUNZ, B. A., STRAFFON, A. F. et VONARX, E. J. (2000). DNA damage-induced mutation : tolerance via translesion synthesis. *Mutat Res*, 451(1-2):169–185.
- [Le Berre et al., 2003] LE BERRE, V., TRÉVISIOL, E., DAGKESSAMANSKAIA, A., SOKOL, S., CAMINADE, A.-M., MAJORAL, J. P., MEUNIER, B. et FRANÇOIS, J. (2003). Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(16):e88.
- [Lee et al., 2009] LEE, C.-Y. I., DELANEY, J. C., KARTALOU, M., LINGARAJU, G. M., MAOR-SHOSHANI, A., ESSIGMANN, J. M. et SAMSON, L. D. (2009). Recognition and processing of a new repertoire of DNA substrates by human 3-methyladenine DNA glycosylase (AAG). *Biochemistry*, 48(9):1850–1861.

- [Lehmann, 2003] LEHMANN, A. R. (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie*, 85(11):1101–1111.
- [Leibeling *et al.*, 2006] LEIBELING, D., LASPE, P. et EMMERT, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol*, 37(5-7):225–238.
- [Levene, 1919] LEVENE, P. (1919). The structure of yeast nucleic acid. *J Biol Chem*, 40:415–424.
- [Li *et al.*, 2000a] LI, J. J., GEYER, R. et TAN, W. (2000a). Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*, 28(11):E52.
- [Li *et al.*, 2000b] LI, J. W. J., FANG, X. H., SCHUSTER, S. M. et TAN, W. H. (2000b). Molecular beacons : A novel approach to detect protein - DNA interactions. *Angewandte Chemie-International Edition*, 39(6):1049–+.
- [Lim et Li, 1996] LIM, A. et LI, B. F. (1996). The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization : the possible implications. *EMBO J*, 15(15):4050–4060.
- [Lim *et al.*, 2008] LIM, S. Y., CHUNG, W.-Y., LEE, H. K., PARK, M. S. et PARK, H. G. (2008). Direct and nondestructive verification of PNA immobilization using click chemistry. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(4):633–636.
- [Lindahl, 1974] LINDAHL, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(9):3649–3653.
- [Lindahl, 1993] LINDAHL, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422):709–715.
- [Liu *et al.*, 2007] LIU, B., YANG, X., WANG, K., TAN, W., LI, H. et TANG, H. (2007). Real-time monitoring of uracil removal by uracil-DNA glycosylase using fluorescent resonance energy transfer probes. *Anal Biochem*, 366(2):237–243.
- [Liu et Gerson, 2004] LIU, L. et GERSON, S. L. (2004). Therapeutic impact of methoxyamine : blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs*, 5(6):623–627.
- [Liu et Gerson, 2006] LIU, L. et GERSON, S. L. (2006). Targeted modulation of MGMT : clinical implications. *Clin Cancer Res*, 12(2):328–331.
- [Liu *et al.*, 2002] LIU, L., NAKATSURU, Y. et GERSON, S. L. (2002). Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 8(9):2985–2991.
- [Liu *et al.*, 2006] LIU, W.-F., YU, S.-S., CHEN, G.-J. et LI, Y.-Z. (2006). DNA damage checkpoint, damage repair, and genome stability. *Yi Chuan Xue Bao*, 33(5):381–390.
- [Liu *et al.*, 2008] LIU, Y. M., GUO, Z. M., JIN, Y., XUE, X. Y., XU, Q., ZHANG, F. F. et LIANG, X. M. (2008). "click oligo(ethylene glycol)" : An excellent orthogonal stationary phase to C18 for two-dimensional reversed-phase/reversed-phase liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 1206(2):153–159.
- [Liuzzi et Talpaert-Borlé, 1985] LIUZZI, M. et TALPAERT-BORLÉ, M. (1985). A new approach to the study of the base-excision repair pathway using methoxyamine. *J Biol Chem*, 260(9):5252–5258.

- [Ljungman, 2009] LJUNGMAN, M. (2009). Targeting the DNA damage response in cancer. *Chem Rev*, 109(7):2929–2950.
- [Lockhart *et al.*, 1996] LOCKHART, D. J., DONG, H., BYRNE, M. C., FOLLETTIE, M. T., GALLO, M. V., CHEE, M. S., MITTMANN, M., WANG, C., KOBAYASHI, M., HORTON, H. et BROWN, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14(13):1675–1680.
- [Loeb et Preston, 1986] LOEB, L. A. et PRESTON, B. D. (1986). Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annu Rev Genet*, 20:201–230.
- [Lu *et al.*, 2001] LU, A. L., LI, X. H., GU, Y. S., WRIGHT, P. M. et CHANG, D. Y. (2001). Repair of oxidative DNA damage - Mechanisms and functions. *Cell Biochemistry And Biophysics*, 35(2):141–170.
- [Lu *et al.*, 2007] LU, C. C., HUANG, H. T., WANG, J. T., SLUPPHAUG, G., LI, T. K., WU, M. C., CHEN, Y. C., LEE, C. P. et CHEN, M. R. (2007). Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication. *Journal Of Virology*, 81(3):1195–1208.
- [Lukin et de Los Santos, 2006] LUKIN, M. et de LOS SANTOS, C. (2006). NMR structures of damaged DNA. *Chem Rev*, 106(2):607–686.
- [Mahajan *et al.*, 2009] MAHAJAN, S., SETHI, D., SETH, S., KUMAR, A., KUMAR, P. et GUPTA, K. C. (2009). Construction of oligonucleotide microarrays (biochips) via thioether linkage for the detection of bacterial meningitis. *Bioconjug Chem*, 20(9):1703–1710.
- [Mahajan *et al.*, 2008] MAHAJAN, S., SWAMI, A., SETHI, D., KUMAR, P. et GUPTA, K. C. (2008). Oligonucleotide microarrays with stem-loop probes : enhancing the hybridization of nucleic acids for sensitive analysis. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(12):3585–3588.
- [Maher *et al.*, 2007] MAHER, R. L., VALLUR, A. C., FELLER, J. A. et BLOOM, L. B. (2007). Slow base excision by human alkyladenine DNA glycosylase limits the rate of formation of AP sites and AP endonuclease 1 does not stimulate base excision. *DNA Repair (Amst)*, 6(1):71–81.
- [Major *et al.*, 1991] MAJOR, G. N., GARDNER, E. J. et LAWLEY, P. D. (1991). Direct assay for O6-methylguanine-DNA methyltransferase and comparison of detection methods for the methylated enzyme in polyacrylamide gels and electroblots. *Biochem J*, 277 (Pt 1):89–96.
- [Maksimenko *et al.*, 2004] MAKSIMENKO, A., ISHCENKO, A. A., SANZ, G., LAVAL, J., ELDER, R. H. et SAPARBAEV, M. K. (2004). A molecular beacon assay for measuring base excision repair activities. *Biochem Biophys Res Commun*, 319(1):240–246.
- [Marenstein *et al.*, 2003] MARENSTEIN, D. R., CHAN, M. K., ALTAMIRANO, A., BASU, A. K., BOORSTEIN, R. J., CUNNINGHAM, R. P. et TEEBOR, G. W. (2003). Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity. *J Biol Chem*, 278(11):9005–9012.
- [Marenstein *et al.*, 2004] MARENSTEIN, D. R., WILSON, D. M. et TEEBOR, G. W. (2004). Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA. *DNA Repair (Amst)*, 3(5):527–533.
- [Margison *et al.*, 2003] MARGISON, G. P., POVEY, A. C., KAINA, B. et KOREF, M. F. S. (2003). Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24(4):625–635.

- [Marras *et al.*, 2002] MARRAS, S. A. E., KRAMER, F. R. et TYAGI, S. (2002). Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res*, 30(21):e122.
- [Martin, 2008] MARTIN, L. J. (2008). DNA damage and repair : relevance to mechanisms of neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(5):377–387.
- [Martinez *et al.*, 2009] MARTINEZ, K., ESTEVEZ, M.-C., WU, Y., PHILLIPS, J. A., MEDLEY, C. D. et TAN, W. (2009). Locked nucleic acid based beacons for surface interaction studies and biosensor development. *Anal Chem*, 81(9):3448–3454.
- [Matsumoto *et al.*, 2010] MATSUMOTO, N., TOGA, T., HAYASHI, R., SUGASAWA, K., KATAYANAGI, K., IDE, H., KURAOKA, I. et IWAI, S. (2010). Fluorescent probes for the analysis of DNA strand scission in base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 38(7):e101.
- [Mayor *et al.*, 2010] MAYOR, J. A., SUN, J., KOTARIA, R., WALTERS, D. E., OH, K. J. et KAPLAN, R. S. (2010). Probing the effect of transport inhibitors on the conformation of the mitochondrial citrate transport protein via a site-directed spin labeling approach. *J Bioenerg Biomembr*, 42(2):99–109.
- [McAuley-Hecht *et al.*, 1994] MCAULEY-HECHT, K. E., LENOARD, G. A., GIBSON, N. J., THOMSON, J. B., WATSON, W. P., HUNTER, W. N. et BROWN, T. (1994). Crystal-structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base-pairs. *Biochemistry*, 33(34):10266–10270.
- [Meira *et al.*, 2009] MEIRA, L. B., MOROSKI-ERKUL, C. A., GREEN, S. L., CALVO, J. A., BRONSON, R. T., SHAH, D. et SAMSON, L. D. (2009). Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3):888–893.
- [Mirbahai *et al.*, 2010] MIRBAHAI, L., KERSHAW, R. M., GREEN, R. M., HAYDEN, R. E., MELDRUM, R. A. et HODGES, N. J. (2010). Use of a molecular beacon to track the activity of base excision repair protein OGG1 in live cells. *DNA Repair (Amst)*, 9(2):144–152.
- [Mishina *et al.*, 2006] MISHINA, Y., DUGUID, E. M. et HE, C. (2006). Direct reversal of DNA alkylation damage. *Chem Rev*, 106(2):215–232.
- [Moser *et al.*, 2000] MOSER, A. M., PATEL, M., YOO, H., BALIS, F. M. et HAWKINS, M. E. (2000). Real-time fluorescence assay for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Anal Biochem*, 281(2):216–222.
- [Moses et Moorhouse, 2007] MOSES, J. E. et MOORHOUSE, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36(8):1249–1262.
- [Mouret *et al.*, 2010] MOURET, S., PHILIPPE, C., GRACIA-CHANTEGREL, J., BANYASZ, A., KARPATI, S., MARKOVITSI, D. et DOUKI, T. (2010). UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers in DNA : a direct photochemical mechanism ? *Org Biomol Chem*, 8(7):1706–1711.
- [Nagel *et al.*, 2003] NAGEL, G., BRENNER, W., JOHNSON, K. et KAINA, B. (2003). DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in testis and testicular tumors as determined by a novel nonradioactive assay. *Anal Biochem*, 321(1):38–43.
- [Naiser *et al.*, 2008] NAISER, T., EHLE, O., KAYSER, J., MAI, T., MICHEL, W. et OTT, A. (2008). Impact of point-mutations on the hybridization affinity of surface-bound DNA/DNA and RNA/DNA oligonucleotide-duplexes : comparison of single base mismatches and base bulges. *BMC Biotechnol*, 8:48.

- [Naumann *et al.*, 2009] NAUMANN, S. C., ROOS, W. P., JÖST, E., BELOHLAVEK, C., LENNERZ, V., SCHMIDT, C. W., CHRISTMANN, M. et KAINA, B. (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells : response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53. *Br J Cancer*, 100(2):322–333.
- [Neidle et Thurston, 2005] NEIDLE, S. et THURSTON, D. E. (2005). Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. *Nature Reviews Cancer*, 5(4):285–296.
- [Nilsen *et al.*, 2001] NILSEN, H., HAUSHALTER, K. A., ROBINS, P., BARNES, D. E., VERDINE, G. L. et LINDAHL, T. (2001). Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome : role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J*, 20(15):4278–4286.
- [Norman *et al.*, 2000] NORMAN, D. G., GRAINGER, R. J., UHRÍN, D. et LILLEY, D. M. (2000). Location of cyanine-3 on double-stranded DNA : importance for fluorescence resonance energy transfer studies. *Biochemistry*, 39(21):6317–6324.
- [Nouspikel, 2009] NOUSPIKEL, T. (2009). DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair : variations on versatility. *Cell Mol Life Sci*, 66(6):994–1009.
- [Obeid *et al.*, 2008] OBEID, S., YULIKOV, M., JESCHKE, G. et MARX, A. (2008). Enzymatic synthesis of multi spin-labeled DNA. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, (52):373–374.
- [O’Brien et Ellenberger, 2003] O’BRIEN, P. J. et ELLENBERGER, T. (2003). Human alkyladenine DNA glycosylase uses acid-base catalysis for selective excision of damaged purines. *Biochemistry*, 42(42):12418–12429.
- [O’Brien et Ellenberger, 2004] O’BRIEN, P. J. et ELLENBERGER, T. (2004). Dissecting the broad substrate specificity of human 3-methyladenine-DNA glycosylase. *J Biol Chem*, 279(11):9750–9757.
- [Ohndorf *et al.*, 1999] OHNDORF, U. M., ROULD, M. A., HE, Q., PABO, C. O. et LIPPARD, S. J. (1999). Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature*, 399(6737):708–712.
- [Okamoto *et al.*, 2004] OKAMOTO, A., INASAKI, T. et SAITO, I. (2004). Nitroxide-labeled guanine as an ESR spin probe for structural study of DNA. *Bioorg Med Chem Lett*, 14(13):3415–3418.
- [Pardo *et al.*, 2009] PARDO, B., GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. et AGUILERA, A. (2009). DNA repair in mammalian cells : DNA double-strand break repair : how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66(6):1039–1056.
- [Patnaik *et al.*, 2007] PATNAIK, S., SWAMI, A., SETHI, D., PATHAK, A., GARG, B. S., GUPTA, K. C. et KUMAR, P. (2007). N-(iodoacetyl)-N’-(anthraquinon-2-oyl)-ethylenediamine (IAED) : A new heterobifunctional reagent for the preparation of biochips. *Bioconjugate Chemistry*, 18(1):8–12.
- [Pettersen *et al.*, 2007] PETTERSEN, H. S., SUNDHEIM, O., GILLJAM, K. M., SLUPPHAUG, G., KROKAN, H. E. et KAVLI, B. (2007). Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res*, 35(12):3879–3892.
- [Pirrung, 2002] PIRRUNG, M. C. (2002). How to make a DNA chip. *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(8):1277–+.

- [Piton *et al.*, 2007] PITON, N., MU, Y., STOCK, G., PRISNER, T. F., SCHIEMANN, O. et ENGELS, J. W. (2007). Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination. *Nucleic Acids Res*, 35(9):3128–3143.
- [Pompizi *et al.*, 2000] POMPIZI, I., HÄBERLI, A. et LEUMANN, C. J. (2000). Oligodeoxynucleotides containing conformationally constrained abasic sites : a UV and fluorescence spectroscopic investigation on duplex stability and structure. *Nucleic Acids Res*, 28(14):2702–2708.
- [Pons *et al.*, 2010] PONS, B., BELMONT, A.-S., MASSON-GENTEUIL, G., CHAPUIS, V., ODDOS, T. et SAUVAIGO, S. (2010). Age-associated modifications of base excision repair activities in human skin fibroblast extracts. *Mech Ageing Dev*.
- [Prakash *et al.*, 2007] PRAKASH, S., LONG, T. M., SELBY, J. C., MOORE, J. S. et SHANNON, M. A. (2007). "Click" modification of silica surfaces and glass microfluidic channels. *Anal Chem*, 79(4):1661–1667.
- [Preininger *et al.*, 2004] PREININGER, C., BODROSSY, L., SAUER, U., PICHLER, R. et WEILHARTER, A. (2004). ARChip epoxy and ARChip UV for covalent on-chip immobilization of pmoA gene-specific oligonucleotides. *Anal Biochem*, 330(1):29–36.
- [Radicella *et al.*, 1997] RADICELLA, J. P., DHERIN, C., DESMAZE, C., FOX, M. S. et BOITEUX, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(15):8010–8015.
- [Ramachandran *et al.*, 2009] RAMACHANDRAN, S., TEMPLE, B. R., CHANEY, S. G. et DOKHO-
LYAN, N. V. (2009). Structural basis for the sequence-dependent effects of platinum-DNA adducts. *Nucleic Acids Res*, pages 1–15.
- [Rapp *et al.*, 2008] RAPP, M., MAURIZIS, J. C., PAPON, J., LABARRE, P., WU, T.-D., CROISY, A., GUERQUIN-KERN, J. L., MADELMONT, J. C. et MOUNETOU, E. (2008). A new O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase inhibitor associated with a nitrosourea (cystemustine) validates a strategy of melanoma-targeted therapy in murine B16 and human-resistant M4Beu melanoma xenograft models. *J Pharmacol Exp Ther*, 326(1):171–177.
- [Ravanat *et al.*, 2001] RAVANAT, J. L., DOUKI, T. et CADET, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B-Biology*, 63(1-3):88–102.
- [Regulus *et al.*, 2007] REGULUS, P., DUROUX, B., BAYLE, P.-A., FAVIER, A., CADET, J. et RAVANAT, J.-L. (2007). Oxidation of the sugar moiety of DNA by ionizing radiation or bleomycin could induce the formation of a cluster DNA lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(35):14032–14037.
- [Rickman *et al.*, 2003] RICKMAN, D. S., HERBERT, C. J. et AGGERBECK, L. P. (2003). Optimizing spotting solutions for increased reproducibility of cDNA microarrays. *Nucleic Acids Res*, 31(18):e109.
- [Robertson *et al.*, 2009] ROBERTSON, A. B., KLUNGLAND, A., ROGNES, T. et LEIROS, I. (2009). DNA repair in mammalian cells : Base excision repair : the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, 66(6):981–993.
- [Rogers *et al.*, 1999] ROGERS, Y. H., JIANG-BAUCOM, P., HUANG, Z. J., BOGDANOV, V., ANDERSON, S. et BOYCE-JACINO, M. T. (1999). Immobilization of oligonucleotides onto a glass

- support via disulfide bonds : A method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem*, 266(1):23–30.
- [Roguev et Russev, 2000] ROGUEV, A. et RUSSEV, G. (2000). Two-wavelength fluorescence assay for DNA repair. *Anal Biochem*, 287(2):313–318.
- [Rosa *et al.*, 1991] ROSA, S., FORTINI, P., KARRAN, P., BIGNAMI, M. et DOGLIOTTI, E. (1991). Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine : a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo. *Nucleic Acids Res*, 19(20):5569–5574.
- [Rostovtsev *et al.*, 2002] ROSTOVTSEV, V. V., GREEN, L. G., FOKIN, V. V. et SHARPLESS, K. B. (2002). A stepwise huisgen cycloaddition process : Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(14):2596–+.
- [Roth et Samson, 2002] ROTH, R. B. et SAMSON, L. D. (2002). 3-Methyladenine DNA glycosylase-deficient Aag null mice display unexpected bone marrow alkylation resistance. *Cancer Res*, 62(3):656–660.
- [Rozkiewicz *et al.*, 2007] ROZKIEWICZ, D. I., GIERLICH, J., BURLEY, G. A., GUTSMIEDL, K., CARELL, T., RAVOO, B. J. et REINHOUDT, D. N. (2007). Transfer printing of DNA by "click" chemistry. *Chembiochem*, 8(16):1997–2002.
- [Sabanayagam *et al.*, 2000] SABANAYAGAM, C. R., SMITH, C. L. et CANTOR, C. R. (2000). Oligonucleotide immobilization on micropatterned streptavidin surfaces. *Nucleic Acids Res*, 28(8):E33.
- [Sakumi *et al.*, 2003] SAKUMI, K., TOMINAGA, Y., FURUICHI, M., XU, P., TSUZUKI, T., SEKIGUCHI, M. et NAKABEPPU, Y. (2003). Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res*, 63(5):902–905.
- [Sancar *et al.*, 2004] SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., UNSAL-KAÇMAZ, K. et LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73:39–85.
- [Saparbaev et Laval, 1994] SAPARBAEV, M. et LAVAL, J. (1994). Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the Escherichia coli, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13):5873–5877.
- [Sassolas *et al.*, 2008] SASSOLAS, A., LECA-BOUVIER, B. D. et BLUM, L. J. (2008). DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev*, 108(1):109–139.
- [Sauvaigo, 2001] SAUVAIGO, S. (2001). Brevet fr2909417 : Détection et caractérisation de l'activité de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.
- [Sauvaigo *et al.*, 2004] SAUVAIGO, S., GUERNIOU, V., RAPIN, D., GASPARUTTO, D., CAILLAT, S. et FAVIER, A. (2004). An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Anal Biochem*, 333(1):182–192.
- [Sauvaigo *et al.*, 2002] SAUVAIGO, S., PETEC-CALIN, C., CAILLAT, S., ODIN, F. et CADET, J. (2002). Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to dna induced by low doses of gamma-radiation : use of yoyo-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. *Anal Biochem*, 303(1):107–109.
- [Scharer, 2003] SCHARER, O. D. (2003). Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie-International Edition*, 42(26):2946–2974.

- [Schiemann *et al.*, 2007] SCHIEMANN, O., PITON, N., PLACKMEYER, J., BODE, B. E., PRISNER, T. F. et ENGELS, J. W. (2007). Spin labeling of oligonucleotides with the nitroxide TPA and use of PELDOR, a pulse EPR method, to measure intramolecular distances. *Nat Protoc*, 2(4):904–923.
- [Sedgwick *et al.*, 2007] SEDGWICK, B., BATES, P. A., PAIK, J., JACOBS, S. C. et LINDAHL, T. (2007). Repair of alkylated DNA : recent advances. *DNA Repair (Amst)*, 6(4):429–442.
- [Seo *et al.*, 2005] SEO, T. S., BAI, X., KIM, D. H., MENG, Q., SHI, S., RUPAREL, H., LI, Z., TURRO, N. J. et JU, J. (2005). Four-color DNA sequencing by synthesis on a chip using photocleavable fluorescent nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(17):5926–5931.
- [Sharma et Dianov, 2007] SHARMA, R. A. et DIANOV, G. L. (2007). Targeting base excision repair to improve cancer therapies. *Mol Aspects Med*, 28(3-4):345–374.
- [Shinmura *et al.*, 2004] SHINMURA, K., TAO, H., GOTO, M., IGARASHI, H., TANIGUCHI, T., MAEKAWA, M., TAKEZAKI, T. et SUGIMURA, H. (2004). Inactivating mutations of the human base excision repair gene NEIL1 in gastric cancer. *Carcinogenesis*, 25(12):2311–2317.
- [Sicoli *et al.*, 2009] SICOLI, G., MATHIS, G., ACI-SÈCHE, S., SAINT-PIERRE, C., BOULARD, Y., GASPARUTTO, D. et GAMBARELLI, S. (2009). Lesion-induced DNA weak structural changes detected by pulsed EPR spectroscopy combined with site-directed spin labelling. *Nucleic Acids Res*, 37(10):3165–3176.
- [Sicoli *et al.*, 2008] SICOLI, G., MATHIS, G., DELALANDE, O., BOULARD, Y., GASPARUTTO, D. et GAMBARELLI, S. (2008). Double electron-electron resonance (DEER) : A convenient method to probe DNA conformational changes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 47(4):735–737.
- [Siddik, 2002] SIDDIK, Z. (2002). *The cancer handbook*, chapitre Mechanisms of action of cancer chemotherapeutic agents : DNA-interactive alkylating agents and antitumour alkylating agents and antitumour platinum-based drugs, pages 1295–1313. Nature publishing group, London.
- [Silber *et al.*, 1993] SILBER, J. R., MUELLER, B. A., EWERS, T. G. et BERGER, M. S. (1993). Comparison of O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity in brain tumors and adjacent normal brain. *Cancer Res*, 53(14):3416–3420.
- [Simeonov *et al.*, 2009] SIMEONOV, A., KULKARNI, A., DORJSUREN, D., JADHAV, A., SHEN, M., MCNEILL, D. R., AUSTIN, C. P. et WILSON, D. M. (2009). Identification and characterization of inhibitors of human apurinic/aprimidinic endonuclease APE1. *PLoS One*, 4(6):e5740.
- [Slupphaug *et al.*, 2003] SLUPPHAUG, G., KAVLI, B. et KROKAN, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research-Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis*, 531(1-2):231–251.
- [Sousa *et al.*, 2007] SOUSA, M. M. L., KROKAN, H. E. et SLUPPHAUG, G. (2007). DNA-uracil and human pathology. *Molecular Aspects Of Medicine*, 28(3-4):276–306.
- [Spencer *et al.*, 1995] SPENCER, J. P. E., JENNER, A., CHIMEL, K., ARUOMA, O. I., CROSS, C. E., WU, R. et HALLIWELL, B. (1995). DNA-damage in human respiratory-tract epithelial-cells - damage by gas-phase cigarette-smoke apparently involves attack by reactive nitrogen species in addition to oxygen radicals. *Febs Letters*, 375(3):179–182.

- [Spiegel-Kreinecker *et al.*, 2010] SPIEGL-KREINECKER, S., PIRKER, C., FILIPITS, M., LÖTSCH, D., BUCHROITHNER, J., PICHLER, J., SILYE, R., WEIS, S., MICKSCHE, M., FISCHER, J. et BERGER, W. (2010). O6-methylguanine DNA methyltransferase protein expression in tumor cells predicts outcome of temozolomide therapy in glioblastoma patients. *Neuro Oncol*, 12(1): 28–36.
- [Spingler *et al.*, 2001] SPINGLER, B., WHITTINGTON, D. A. et LIPPARD, S. J. (2001). 2.4 angstrom crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex. *Inorganic Chemistry*, 40(22):5596–5602.
- [Spivak et Hanawalt, 2006] SPIVAK, G. et HANAWALT, P. C. (2006). Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)*, 5(1):13–22.
- [Stivers, 1998] STIVERS, J. T. (1998). 2-aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA : metal-ion and base sequence effects. *Nucleic Acids Res*, 26(16):3837–3844.
- [Stivers et Jiang, 2003] STIVERS, J. T. et JIANG, Y. L. (2003). A mechanistic perspective on the chemistry of DNA repair glycosylases. *Chem Rev*, 103(7):2729–2759.
- [Stojic *et al.*, 2004] STOJIC, L., BRUN, R. et JIRICNY, J. (2004). Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9):1091–1101.
- [Strohsahl *et al.*, 2007] STROHSAHL, C. M., MILLER, B. L. et KRAUSS, T. D. (2007). Preparation and use of metal surface-immobilized DNA hairpins for the detection of oligonucleotides. *Nature Protocols*, 2(9):2105–2110.
- [Stupp *et al.*, 2007] STUPP, R., HEGI, M. E., GILBERT, M. R. et CHAKRAVARTI, A. (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma : standard of care and future directions. *J Clin Oncol*, 25(26):4127–4136.
- [Stupp *et al.*, 2009] STUPP, R., HEGI, M. E., MASON, W. P., van den BENT, M. J., TAPHOORN, M. J. B., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., ALLGEIER, A., FISHER, B., BELANGER, K., HAU, P., BRANDES, A. A., GIJTENBEEK, J., MAROSI, C., VECHT, C. J., MOKHTARI, K., WESSELING, P., VILLA, S., EISENHAEUER, E., GORLIA, T., WELLER, M., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., MIRIMANOFF, R.-O., for RESEARCH, E. O., of CANCER BRAIN TUMOUR, T., GROUPS, R. O. et of CANADA CLINICAL TRIALS GROUP, N. C. I. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study : 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 10(5):459–466.
- [Takeshita *et al.*, 1987] TAKESHITA, M., CHANG, C. N., JOHNSON, F., WILL, S. et GROLLMAN, A. P. (1987). Oligodeoxynucleotides containing synthetic abasic sites. model substrates for DNA polymerases and apurinic/apyrimidinic endonucleases. *J Biol Chem*, 262(21):10171–10179.
- [Tornaletti, 2009] TORNALETTI, S. (2009). DNA repair in mammalian cells : Transcription-coupled DNA repair : directing your effort where it's most needed. *Cell Mol Life Sci*, 66(6): 1010–1020.

- [Tornøe *et al.*, 2002] TORNØE, C. W., CHRISTENSEN, C. et MELDAL, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase : [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *Journal Of Organic Chemistry*, 67(9):3057–3064.
- [Trivedi *et al.*, 2005] TRIVEDI, R. N., ALMEIDA, K. H., FORNSAGLIO, J. L., SCHAMUS, S. et SOBOL, R. W. (2005). The role of base excision repair in the sensitivity and resistance to temozolomide-mediated cell death. *Cancer Res*, 65(14):6394–6400.
- [Trivedi *et al.*, 2008] TRIVEDI, R. N., hong WANG, X., JELEZCOVA, E., GOELLNER, E. M., bo TANG, J. et SOBOL, R. W. (2008). Human methyl purine DNA glycosylase and DNA polymerase beta expression collectively predict sensitivity to temozolomide. *Mol Pharmacol*, 74(2):505–516.
- [Tyagi *et al.*, 1998] TYAGI, S., BRATU, D. P. et KRAMER, F. R. (1998). Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*, 16(1):49–53.
- [Tyagi et Kramer, 1996] TYAGI, S. et KRAMER, F. R. (1996). Molecular beacons : probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14(3):303–308.
- [vanBoom *et al.*, 1996] VANBOOM, S. S. G. E., YANG, D. Z., REEDIJK, J., VANDERMAREL, G. A. et WANG, A. H. J. (1996). Structural effect of intra-strand cisplatin-crosslink on palindromic DNA sequences. *Journal Of Biomolecular Structure & Dynamics*, 13(6):989–998.
- [Verbeek *et al.*, 2008] VERBEEK, B., SOUTHGATE, T. D., GILHAM, D. E. et MARGISON, G. P. (2008). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. *Br Med Bull*, 85:17–33.
- [Vidal *et al.*, 2001] VIDAL, A. E., HICKSON, I. D., BOITEUX, S. et RADICELLA, J. P. (2001). Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease : bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res*, 29(6):1285–1292.
- [Wachowius et Höbartner, 2010] WACHOWIUS, F. et HÖBARTNER, C. (2010). Chemical RNA modifications for studies of RNA structure and dynamics. *Chembiochem*, 11(4):469–480.
- [Wang et Lippard, 2005] WANG, D. et LIPPARD, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4):307–320.
- [Wang *et al.*, 2009a] WANG, D., XIANG, D.-B., YANG, X.-Q., CHEN, L.-S., LI, M.-X., ZHONG, Z.-Y. et ZHANG, Y.-S. (2009a). APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. *Lung Cancer*, 66(3):298–304.
- [Wang *et al.*, 2009b] WANG, K. M., TANG, Z. W., YANG, C. Y. J., KIM, Y. M., FANG, X. H., LI, W., WU, Y. R., MEDLEY, C. D., CAO, Z. H., LI, J., COLON, P., LIN, H. et TAN, W. H. (2009b). Molecular engineering of DNA : Molecular beacons. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(5):856–870.
- [Wang *et al.*, 2005] WANG, Y., WANG, H., GAO, L., LIU, H., LU, Z. et HE, N. (2005). Polyacrylamide gel film immobilized molecular beacon array for single nucleotide mismatch detection. *J Nanosci Nanotechnol*, 5(4):653–658.
- [Watkins et SantaLucia, 2005] WATKINS, N. E. et SANTA LUCIA, J. (2005). Nearest-neighbor thermodynamics of deoxyinosine pairs in DNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, 33(19):6258–6267.

- [Wilson *et al.*, 1994] WILSON, B. D., STRAUSS, M., STICKELLS, B. J., van HELDEN, E. G. H. et van HELDEN, P. (1994). An assay for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase based on restriction endonuclease inhibition and magnetic bead separation of products. *Carcinogenesis*, 15(10):2143–2148.
- [Wilson et Barsky, 2001] WILSON, D. M. et BARSKY, D. (2001). The major human abasic endonuclease : formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res*, 485(4):283–307.
- [Wilson et Bohr, 2007] WILSON, D. M. et BOHR, V. A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)*, 6(4):544–559.
- [Wilson *et al.*, 1997] WILSON, D. M., TAKESHITA, M. et DEMPLE, B. (1997). Abasic site binding by the human apurinic endonuclease, Ape, and determination of the DNA contact sites. *Nucleic Acids Res*, 25(5):933–939.
- [Wilson *et al.*, 1995] WILSON, D. M., TAKESHITA, M., GROLLMAN, A. P. et DEMPLE, B. (1995). Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA. *J Biol Chem*, 270(27):16002–16007.
- [Wu *et al.*, 1987] WU, R. S., HURSTACALDERONE, S. et KOHN, K. W. (1987). Measurement of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in human-cells and tumor-tissues by restriction endonuclease inhibition. *Cancer Research*, 47(23):6229–6235.
- [Wu *et al.*, 2007] WU, Y., BHATTACHARYYA, D., KING, C. L., BASKERVILLE-ABRAHAM, I., HUH, S.-H., BOYSEN, G., SWENBERG, J. A., TEMPLE, B., CAMPBELL, S. L. et CHANEY, S. G. (2007). Solution structures of a DNA dodecamer duplex with and without a cisplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link : Comparison with the same DNA duplex containing an oxalipatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link. *Biochemistry*, 46(22):6477–6487.
- [Xanthoudakis *et al.*, 1996] XANTHOUDAKIS, S., SMEYNE, R. J., WALLACE, J. D. et CURRAN, T. (1996). The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17):8919–8923.
- [Xia et O'Connor, 2001] XIA, L. et O'CONNOR, T. R. (2001). DNA glycosylase activity assay based on streptavidin paramagnetic bead substrate capture. *Anal Biochem*, 298(2):322–326.
- [Xie *et al.*, 2004] XIE, Y., YANG, H., CUNANAN, C., OKAMOTO, K., SHIBATA, D., PAN, J., BARNES, D. E., LINDAHL, T., MCILHATTON, M., FISHEL, R. et MILLER, J. H. (2004). Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res*, 64(9):3096–3102.
- [Xu *et al.*, 2008] XU, G., HERZIG, M., ROTREKL, V. et WALTER, C. A. (2008). Base excision repair, aging and health span. *Mech Ageing Dev*, 129(7-8):366–382.
- [Xue et Warshawsky, 2005] XUE, W. L. et WARSHAWSKY, D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage : A review. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 206(1):73–93.
- [Yan *et al.*, 2007] YAN, L., BULGAR, A., MIAO, Y. L., MAHAJAN, V., DONZE, J. R., GERSON, S. L. et LIU, L. L. (2007). Combined treatment with temozolomide and methoxyamine : Blocking apurinic/pyrimidinic site repair coupled with targeting topoisomerase II alpha. *Clinical Cancer Research*, 13(5):1532–1539.

- [Yao et Tan, 2004] YAO, G. et TAN, W. H. (2004). Molecular-beacon-based array for sensitive DNA analysis. *Analytical Biochemistry*, 331(2):216–223.
- [Zammatteo *et al.*, 2000] ZAMMATTEO, N., JEANMART, L., HAMELS, S., COURTOIS, S., LOUETTE, P., HEVESI, L. et REMACLE, J. (2000). Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem*, 280(1):143–150.
- [Zhou et Elledge, 2000] ZHOU, B. B. S. et ELLEDGE, S. J. (2000). The DNA damage response : putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811):433–439.

Annexes

Annexe A

Séquences des sondes oligonucléotidiques utilisées

Cette annexe synthétise l'ensemble des sondes oligonucléotidiques utilisées pour le développement de la biopuce pour la détection des activités de réparation de l'ADN. Les séquences de sondes simple brin utilisées au cours du Chapitre 2 sont reprises dans le tableau A.1. Les séquences des sondes hairpin utilisées au cours du Chapitre 3 sont présentées dans le tableau A.2.

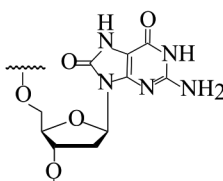
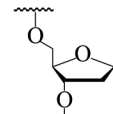
Nom de la sonde	Séquence	Lésion
M	5' X-TT TTT TCG GAT ACC CAA GGA 3'	
M1	5' X-TT TTT TCG GAT ATC CAA GGA 3'	
M2	5' X-TT TTT TCG GAT CCT CAA GGA 3'	
M3	5' X-TT TTT TCG GAT ACA CAA GGA 3'	
M4	5' X-TT TTT TCG 8-oxoG AT ACC CAA GGA 3'	 8-oxoG 8-oxoguanine
M5	5' X-TT TTT TTT TTT TTC G 8-oxoG A TAC CCA AGG A 3'	
M6	5' X-TT TTT TTT TTT TTT TTC GGA 8-oxoG AC CCA AGGA 3'	
M8	5' X-TT TTT TTT TTT TTT TTC G 8-oxoG A GAC CCA A 8-oxoG G A 3'	
M9	5' X-TT TTT TCG GAT AC THF CAA GGA 3'	 THF Tétrahydrofurane

Tableau A.1 – Séquences des sondes nucléiques simple brin utilisées dans le Chapitre 2, où X est le nucléotide 2'-O-propargyl uridine portant la fonction alcyne.




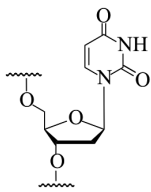


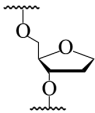

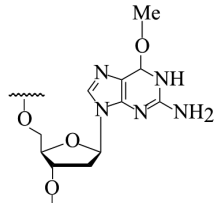


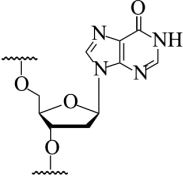
Nom de la sonde	Séquence	Lésion / site de restriction
HP PstI quenchée	5' X-TTT TTT cy3 TGA ACT GCA GCT CCT 3' dabcy1 ACT TGA CGT CGA GGA 	Site de restriction de PstI <div style="text-align: center;"> \downarrow -CTGCAG- -GACGTC- \uparrow </div>
HP PstI fluorescente	5' X-TTT TTT TGA ACT GCA GCT CCT 3' T cy3ACT T GA CGT CGA GGA 	Site de restriction de PstI <div style="text-align: center;"> \downarrow -CTGCAG- -GACGTC- \uparrow </div>
HP Uracile	5' X-TTT TTT TGA AC U GCA GCT CCT 3' T cy3 ACT TG A CGT CGA GGA 	 U Uracile
HP Uracile 12T	5' X-TTT TTT TTT TTT TGA AC U GCA GCT CCT 3' T cy3 ACT TG A CGT CGA GGA 	
HP THF	5' X-TTT TTT TGA AC THF GCA GCT CCT 3' T cy3 ACT TG A CGT CGA GGA 	 THF Tétrahydrofurane
HP O6MeG	5' X-TTT TTT TGA ACT O6MeG CA GCT CCT 3' T cy3 ACT TGA C GT CGA GGA 	 O6MeG O6-Méthylguanine
HPEcoRI	5' X-TTT TTT TGA AGA ATT CCT CCT 	Site de restriction de EcoRI <div style="text-align: center;"> \downarrow -GAATTC- -CTTAAG- \uparrow </div>
HP Inosine	5' X-TTT TTT TGA AGA I TT CCT CCT 	 I Inosine

Tableau A.2 – Séquences des sondes hairpin utilisées dans le Chapitre 3, où X est le nucléotide 2'-O-propargyle uridine portant la fonction alcyne.

Annexe B

Rapport de stage de master 2 de Guillaume Gines (Janvier-Juin 2010)

Nous avons vu que le système de biopuces présenté dans ce manuscrit, apporte de nombreux avantages et trouve de nombreuses applications dans l'étude des lésions de l'ADN et de leur réparation. Cependant, de tels biocapteurs comportent certaines limitations du fait notamment des importants investissements nécessaires à la préparation et à l'analyse de ceux-ci. Ainsi, nous travaillons au développement d'autres systèmes de sondes oligonucléotidiques supportées sur des billes, permettant de contrecarrer certaines de ces limitations. Camille Désiron a tout d'abord réalisé une preuve de concept sur un premier système de billes de silice au cours de son stage de master 2 effectué au laboratoire entre janvier et juin 2009. Guillaume Gines, étudiant en master 2 effectuant son stage au laboratoire entre janvier et juin 2010, a poursuivi cette étude en réalisant la fonctionnalisation de billes magnétiques par des oligonucléotides lésés fluorescents, permettant la détection des activités de coupure suivant un principe similaire à celui exposé dans le Chapitre 3 de ce manuscrit. Le document présenté dans cette annexe est constitué de son rapport de stage, décrivant les principaux résultats obtenus avec ce système.

Sommaire

ABREVIATIONS	1
I. Introduction.....	2
1. LES DOMMAGES DE L'ADN	2
2. LES SYSTEMES DE REPARATION DE L'ADN	3
3. CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	4
II. Résultats/Discussion	7
1. SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES SONDÉS NUCLEIQUES	7
1.1 STRUCTURES	7
1.2 CONTRÔLE QUALITÉ	8
2. IMMOBILISATION DES SONDÉS NUCLEIQUES SUR BILLES.....	9
3. ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE L'AAG ET DES AP-ENDONUCLEASES DE LA BER	10
3.1 DÉTECTION D'UNE ACTIVITÉ DE RÉPARATION À PARTIR D'ENZYMES PURIFIÉES	11
3.2 DÉTECTION D'UNE ACTIVITÉ DE RÉPARATION AU SEIN D'UN EXTRAIT NUCLEAIRE	11
4. INHIBITION DE L'ACTIVITÉ AP-ENDONUCLEASE PAR LA METHOXYAMINE	15
III. Conclusion/ Perspectives	16
IV. Matériel et Méthodes	17
1. SYNTHÈSE DES OLIGONUCLEOTIDES.....	17
2. PURIFICATION DES MÉLANGES BRUTS DE SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DES OLIGONUCLEOTIDES	18
2.1 ANALYSE PAR HPLC	18
2.2 SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF	18
2.3 ANALYSE DES SÉQUENCES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	19
3. HYBRIDATION DES OLIGONUCLEOTIDES (FORMATION DES DUPLEXES HAIRPINS)	19
4. IMMOBILISATION DES SONDÉS NUCLEIQUES SUR BILLES <i>DYNABEADS® M280-STREPTA</i>	20
4.1 PRÉPARATION DES BILLES.....	20
4.2 PRÉPARATION DE LA SOLUTION D'OLIGONUCLEOTIDE ET IMMOBILISATION SUR BILLES	20
4.3 CONDITIONNEMENT DES BILLES FONCTIONNALISÉES	20
5. DIGESTIONS ENZYMATIQUES.....	21
5.1 PAR LES ENZYMES PURIFIÉES.....	21
5.2 PAR DES EXTRAITS NUCLEAIRES	21
V. Bibliographie	22
VI. Annexes.....	23
1) STRUCTURES CHIMIQUES DES LÉSIONS ÉTUDIÉES ET DES SYNTHONS UTILISÉS	23
2) SCHEMA DE LA SYNTHÈSE AUTOMATISÉE DES OLIGONUCLEOTIDES SUR SUPPORT PAR CHIMIE DES PHOSPHORAMIDITES ..	23
3) STRUCTURE DES LÉSIONS ET PRODUITS DE COUPURE PAR LES ENZYMES DE LA BER.....	24
4) CONTRÔLE QUALITÉ DES SONDÉS.....	25

Abréviations

A	Adénine
Aag	Alkyle adénine glycosylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	Apurique/apyrimidinique
APS	Persulfate d'ammonium
BER	Réparation par excision de base
BSA	Albumine de sérum bovin
C	Cytosine
CPG	"Controlled pore glass"
Cy3	Cyanine 3
dA	2'-désoxyadénosine
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
dC	2'-désoxycytidine
dG	2'-désoxyguanosine
DN	Double négatif
dT	Thymidine
DTT	Dithiotréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	Acide éthylène glycol tétra-acétique
G	Guanine
hAPE	AP-endonucléase humaine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
MALDI	Matrix assisted laser desorption and ionization
MGMT	Méthyle guanine méthyle transférase
Mx	Méthoxyamine
O ⁶ MeGua	O ⁶ -méthylguanine
ODN	Oligonucléotide
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
T	Thymine
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCA	Acide trichloroacétique
TEAA	Triéthylammonium acétate
TEG	Triéthylèneglycol
TEMED	Tétramethylethylenediamine
THF	Tétrahydrofurane
TMZ	Témozolomide
TOF	Time of flight
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultra-Violet

I. Introduction

Notre génome, composé de 3×10^9 paires de bases, contient toutes les instructions nécessaires au développement, au fonctionnement, au maintien de l'intégrité et à la reproduction des cellules et de l'organisme. L'ensemble des gènes portés par l'ADN permet donc l'harmonisation et la survie d'un organisme et est le support essentiel de l'hérédité.

Cependant l'ADN est une molécule chimique possédant une réactivité non négligeable vis-à-vis d'agents endogènes - tels que les espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou encore des produits secondaires d'acides gras polyinsaturés - et exogènes tels que le tabac, les médicaments chimiothérapeutiques, les rayonnements ionisants¹... Ces multiples sources d'agression peuvent induire des modifications de la structure de la macromolécule, pouvant aboutir à des mutations². Une mutation est une altération de la séquence originelle du génome et peut conduire à l'apparition d'un cancer. Les lésions engendrées peuvent également bloquer certains processus cellulaires comme la réplication ou la transcription. L'arrêt de ces processus cellulaires vitaux entraîne la mort de la cellule par apoptose. Les organismes ont donc évolué de façon à contrecarrer les effets nuisibles de l'ADN endommagé afin de maintenir l'intégrité du génome et la transmission du matériel génétique intact lors de la division cellulaire. Après avoir décrit, brièvement les principales lésions connues de l'ADN nous verrons quels systèmes de réparation les organismes ont développés pour les réparer.

1. Les dommages de l'ADN

La réaction chimique la plus simple, mais potentiellement dangereuse pour l'ADN est l'hydrolyse. La liaison N-glycosidique (notamment des bases puriques) y est très sensible et conduit à la formation de sites abasiques (sites AP). Ces sites abasiques correspondent à une perte de l'information génétique et sont donc hautement mutagènes. De plus ces sites abasiques sont très labiles et peuvent spontanément induire des cassures simple brin au sein de la double hélice. Les fonctions amines exocycliques des bases Adénine, Guanine et Cytosine sont également sujettes à l'hydrolyse. Les nucléotides issus de la désamination de ces bases peuvent entraîner des erreurs de réplication à l'origine de mésappariements (mismatches).

Les EROs et autres sous produits du métabolisme de l'oxygène peuvent engendrer des modifications oxydatives de l'ADN, la plus connue étant la 8-oxoguanine, la guanine ayant le potentiel d'oxydation le plus haut. Cette lésion est mutagène car elle induit un mésappariement avec l'adénine lors du cycle de réplication. Ce mésappariement est à l'origine d'une mutation de type transversion car le couple G-C devient T-A après réplication.

Certains agents, dits alkylants monofonctionnels, tels que la S-adénosylméthionine et N-alkyl-nitrosourées, réagissent avec les groupements riches en électrons des bases azotées (N^7 et O^6

de la guanine, N^3 de l'adénine...). Les produits provenant de l'alkylation en N^7 mènent souvent à la formation de sites AP par dépurination spontanée. En revanche d'autres types d'adduits dont les N^3 -alkyl-adénine sont hautement cytotoxiques car ils bloquent le processus de réplication. Les agents alkylants, dits bifonctionnels, dont certains sont employés en chimiothérapie (par exemple le cisplatine), induisent la formation de pontages intra- ou inter-brin dans la double hélice d'ADN. Cela mène à la formation d'adduits volumineux, létaux pour les cellules car ils empêchent l'ouverture de la double hélice lors de la réplication.

D'autres agents environnementaux comme le rayonnement ultra-violet peuvent également mener à la formation de photo-adduits, principalement les dimères cyclobutanes et les adduits 6-4.

2. Les systèmes de réparation de l'ADN

Les organismes ont développé des mécanismes particulièrement efficaces, capable de réparer spécifiquement chaque type de lésion. Chacun d'entre eux est spécialisé dans la prise en charge d'un ou de plusieurs types de lésions de l'ADN^{3,4} (Figure 1).

Les dimères de pyrimidines, les adduits O^6 -alkylguanine et O^4 -alkylthymine sont réparés par **réversion directe** (RR) des dommages, par des photolyases et par des alkyltransférases respectivement. Chez les mammifères seulement les adduits O^6 -alkylguanine et O^4 -alkylthymine sont réparés de cette façon. En effet, la Méthyle Guanine Méthyle Transférase (MGMT) lutte contre l'effet mutagène de la O^6 -méthylguanine en transférant le groupement alkyle de l'ADN vers une cystéine. La réaction est irréversible et l'enzyme est ensuite dirigée vers le protéasome pour être dégradée (enzyme suicide).

La voie de **réparation des mésappariements** (MMR) est activée par la présence de bases mal appariées provenant d'erreurs d'incorporation de nucléotides par les polymérases ou de transversions ou transitions dans la double hélice.

Les dommages résultant de la désamination, de l'oxydation et de l'alkylation de bases sont principalement pris en charge par le système de **réparation par excision de base** (BER) détaillé dans le chapitre suivant.

Les lésions plus volumineuses de type dimères de pyrimidines, les adduits du platine et autres alkylants bifonctionnels sont éliminés par le système de **réparation par excision de nucléotides** (NER). Ce système fait intervenir un complexe protéique qui excise entre 10 et 30 nucléotides autour de la lésion permettant à une polymérase de régénérer le brin originel.

Les cassures double brin peuvent être prises en charge par deux grandes voies de réparation par recombinaison : la **recombinaison homologue** (HRR), qui est un mécanisme assez lent mais qui assure la restauration fidèle de la séquence, en utilisant le chromosome homologue non endommagé comme matrice ; et la **recombinaison par jonction d'extrémités** (NHEJ), plus rapide

mais qui peut conduire à l'insertion ou à la délétion de quelques nucléotides au moment de la ligation des deux fragments d'ADN.

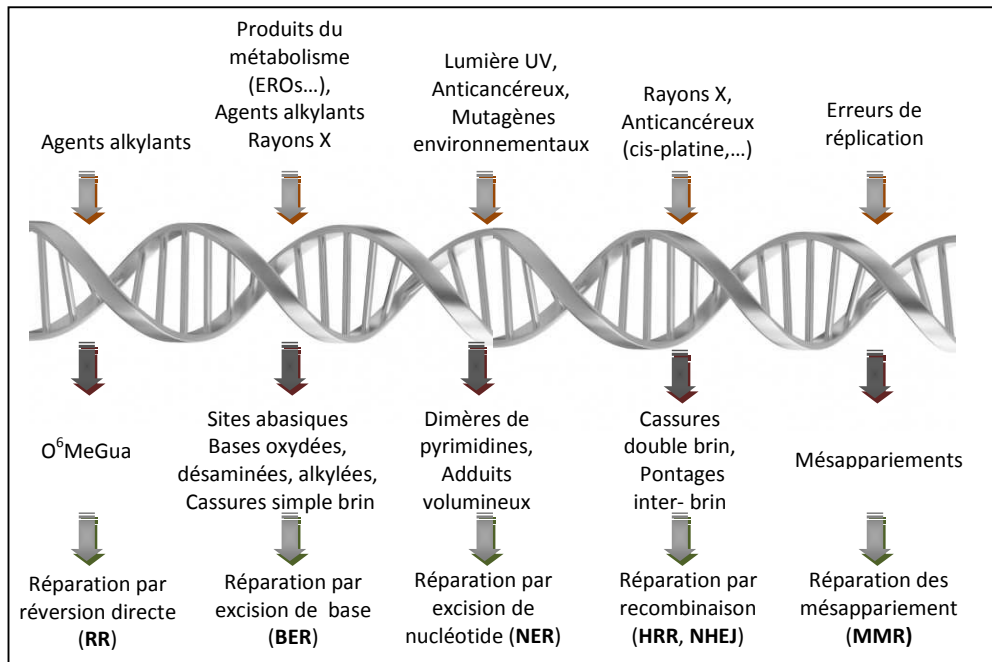


Figure 1: Différentes sources de dommages de l'ADN, types de lésions engendrées et les systèmes de réparation associés.

3. Contexte et objectifs de l'étude

L'étude des différents systèmes de réparation énoncés précédemment permet de mieux cerner et comprendre leur importance et leurs rôles dans de nombreuses pathologies et notamment dans les processus de cancérogénèse et tumorigénèse⁵. De plus, il apparaît que la surexpression de certaines activités de réparation de l'ADN est liée à une résistance de certains cancers aux traitements antitumoraux⁶.

Ainsi, développer des outils qui permettent la détection et la quantification d'une activité spécifique de tels systèmes de réparation pourrait aider au diagnostic de différentes pathologies (cancers, certaines maladies génétiques...) mais aussi à l'ajustement des traitements chimio- et radiothérapeutiques en fonction du niveau d'activité de réparation dans les cellules tumorales. D'autre part, de tels outils biotechnologiques utilisables en format criblage haut débit permettraient le développement d'inhibiteurs des enzymes des systèmes de réparation, pouvant potentialiser l'action des médicaments anticancéreux⁷.

De nombreux travaux ont été menés visant à mettre au point des dispositifs permettant de miniaturiser et de paralléliser l'analyse de la réparation des lésions nucléiques^{8,9}.

L'objectif de ce stage est de mettre au point de nouvelles sondes nucléiques fluorescentes pour la détection des lésions de l'ADN et de leur réparation sur des particules fonctionnalisées. Ceci

implique la conception et la caractérisation du dispositif. Ce dernier doit remplir le cahier des charges suivant :

- Etre spécifique d'une enzyme ou d'un complexe protéique ciblant une lésion particulière.
- Etre suffisamment sensible pour permettre la détection d'une activité enzymatique dans un extrait cellulaire
- Permettre une analyse rapide, quantitative et aisée de l'activité enzymatique visée
- Permettre le criblage d'inhibiteurs ou d'extraits cellulaires.

Au cours de cette étude nous nous sommes principalement intéressés à la réparation par excision de base (BER)³, qui répare les lésions peu volumineuses de l'ADN (modifications de bases). Ce processus (Figure 2) est initié par la reconnaissance et l'excision de la base lésée par une glycosylase spécifique de la lésion (par exemple l'Alkyle Adénine Glycosylase dans le cas des purines alkylées en position N^7 ou N^3). Celle-ci hydrolyse le lien N-glycosidique entre la base et le sucre et forme un site abasique (AP). Ce dernier est ensuite reconnu par une AP-endonucléase, qui coupe le lien phosphodiester en 5' du site AP. A noter qu'il existe des glycosylases dites « bifonctionnelles » qui possèdent également cette activité AP-lyase. Une série d'enzymes intervient ensuite pour restaurer le brin endommagé : une nucléase clive le lien phosphodiester en 3' du site abasique générant un « trou » dans le brin endommagé. Une polymérase et une ligase se chargent ensuite de colmater le trou et de restaurer la continuité du brin et l'intégrité du message génétique.

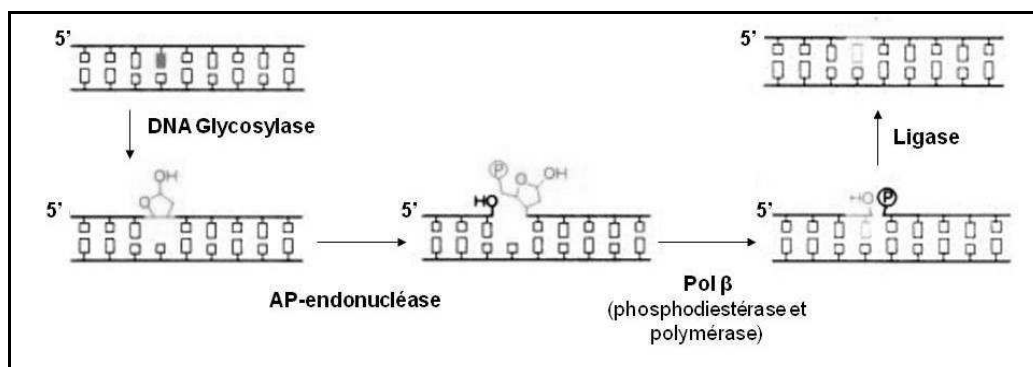


Figure 2 : Schéma synthétique de la réparation par excision de base (adapté de [3])

Dans le but d'étudier l'activité des enzymes de la BER, des sondes oligonucléotidiques originales ont été développées au laboratoire¹⁰. Ces dernières possèdent une structure autoccomplémentaire en forme d'épingle à cheveux (« hairpin ») mimant ainsi un double brin d'ADN. La modification sélective de sa séquence par un nucléotide lésé permet de la rendre substrat d'une ou de plusieurs enzymes de la BER. Des travaux précédents utilisaient ce type de sondes, de type molecular beacon, modifiées aux extrémités 3' et 5' par deux chromophores¹¹: un fluorophore et un quencher. En solution lorsque la sonde est hybridée, la fluorescence est éteinte par la présence du quencher qui fait face au fluorophore. Lorsque les enzymes de la BER reconnaissent

la lésion, l'oligonucléotide est clivé au niveau du nucléotide lésé. De ce fait, le fragment contenant le fluorophore se déshybride de celui contenant le quencher induisant une augmentation du signal fluorescent. Ainsi, l'activité de réparation est visualisée par la détection d'une variation de fluorescence. Ce type de sondes a permis la détection de l'activité de nombreuses glycosylases monofonctionnelles ou bifonctionnelles, d'AP-endonucléases et autres nucléases^{8,12}.

La suite de ces études a consisté à transférer les tests de détection enzymatique en solution vers un système supporté. La preuve du concept a été réalisée par Mélanie Flaender, actuellement en 3^{ème} année de thèse au sein du laboratoire, qui met à point une biopuce en fonctionnalisant des lames de verre avec ces sondes nucléiques lésées. Le système a également été dérivé sur bille par Camille Désiron, stagiaire en 2009 au sein du Laboratoire des Acides Nucléiques, qui a synthétisé les sondes sur des microbilles de verre (CPG, utilisées en synthèse d'ADN sur support) qui permettent la déprotection des oligonucléotides indépendamment de leur coupure du support. Ces microbilles ont donc servi de support pour l'analyse d'activités de réparation, sans étape de purification des sondes. L'utilisation d'un test supporté possède plusieurs avantages, tels que la stabilisation des oligonucléotides vis-à-vis des nucléases. Un tel système original a montré son efficacité notamment lors de l'étude de l'Uracile *N*-Glycosylase qui est une glycosylase monofonctionnelle. En effet, les travaux de Camille ont montré que le système développé permet un lavage des billes qui facilite le changement des conditions enzymatiques (pH, force ionique,...) pour la réalisation d'une seconde étape de coupure par l'AP-endonucléase. Cependant, le dispositif initial ne comprend pas d'étape de purification des oligonucléotides, qui sont synthétisés et utilisés directement sur le support pour les tests enzymatiques. De plus les billes de synthèse utilisées de 65 µm de diamètre sédimentent rapidement ce qui nécessite une quantification fastidieuse des microbilles sous microscope pour la reproductibilité des expériences et la quantification des activités enzymatiques mesurées.

L'objectif de mon stage est d'optimiser ce dispositif en utilisant des billes plus petites, magnétiques, sur lesquelles on pourrait greffer des oligonucléotides purifiés (Figure 3). On espère ainsi obtenir une meilleure sensibilité du test et permettre une manipulation du dispositif facilitée.

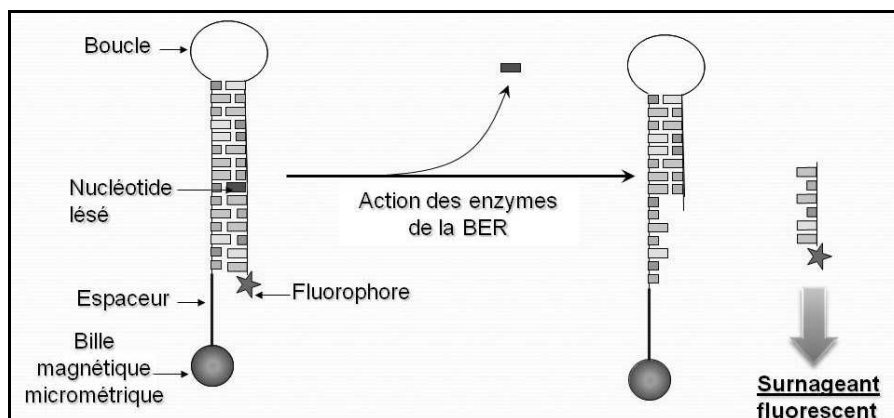


Figure 3 : Principe de la détection d'une activité de réparation de l'ADN par fluorescence, sur billes magnétiques

Mon stage s'est donc décomposé en plusieurs points.

- Synthétiser chimiquement les sondes oligonucléotidiques modifiées et les purifier
- Fonctionnaliser la surface des billes magnétiques par ces fragments d'ADN substrats
- Tester la fonctionnalité de ces oligonucléotides en solution et sur billes
- Mettre au point le test de détection par fluorescence de l'activité enzymatique des protéines de réparation (Aag, AP-endonucléase): à partir d'enzymes purifiées dans un premier temps puis, en criblant différents extraits cellulaires (discrimination d'activité...)
- Déterminer la sensibilité de ce test
- Adapter ce test à la détection de plusieurs systèmes de réparation

II. Résultats/Discussion

1. Synthèse et caractérisation des sondes nucléiques

Les ODN ont été synthétisés sur support par la voie phosphoramidite à l'aide d'un synthétiseur d'ADN (cf. annexe 2). Les rendements de chaque étape sont estimés par une lecture de l'absorbance du cation diméthoxytrityle à 498 nm lors de l'étape de déprotection du 5'-OH. Le rendement d'un couplage est de 97-98%. Au final on estime que 30 à 35 % des oligonucléotides présent à la surface du support possèdent la bonne séquence. Les ODN sont ensuite purifiés par HPLC. Le rendement final de synthèse et purification est compris entre 10 et 15%.

1.1 Structures

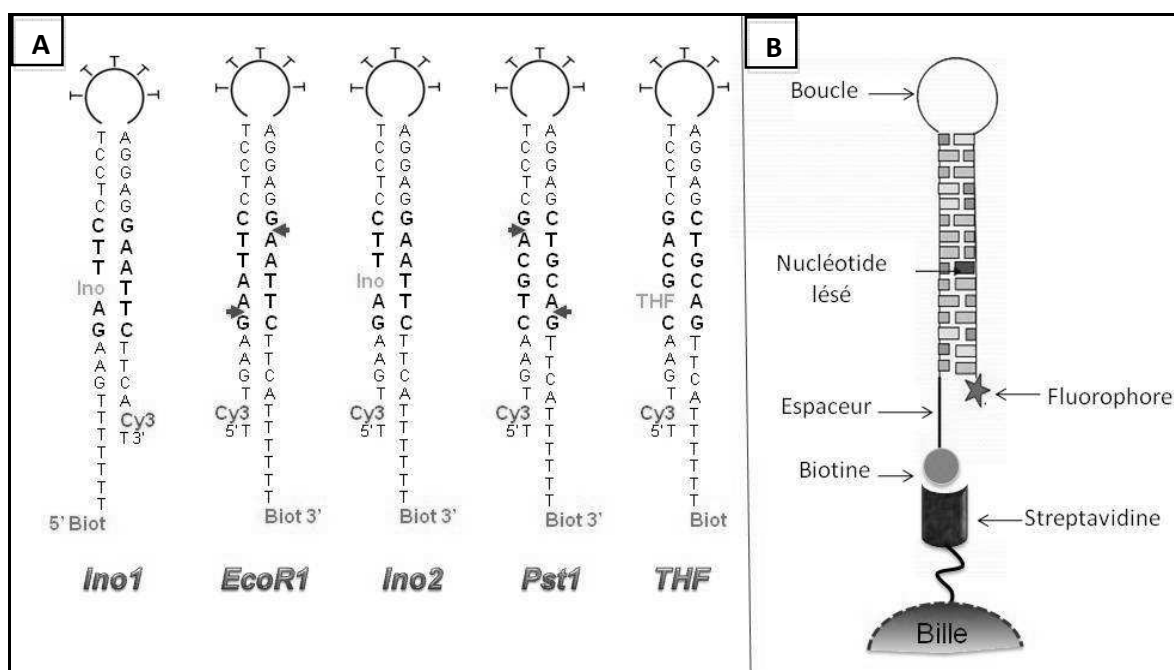


Figure 4 A) Séquences d'ADN synthétisées et utilisées dans la présente étude; B) Représentation schématique de l'outil « sonde nucléique fluorescente sur billes magnétiques »

Toutes ces sondes (Figure 4) contiennent le motif biotine-triéthylèneglycol, noté « Biot » (cf. annexe 1), suivi de six thymidines non appariées utilisées comme espaceur. A l'autre extrémité a été introduit le fluorophore Cyanine3 (Cy3 cf. annexe 1) pour la détection de l'activité de réparation. Le marquage fluorescent possède l'avantage d'être plus facile à mettre en œuvre que le marquage radioactif qui nécessite des précautions supplémentaires et un matériel adapté à la manipulation de la radioactivité (risque d'irradiation, élimination des déchets,...). D'autre part, c'est une technique de détection hautement sensible : la limite de détection est de l'ordre de la dizaine de nM. A noter qu'il a été choisi de travailler ici avec des sondes non quenchées pour pouvoir suivre précisément la localisation des sondes (sur billes ou en solution). La boucle simple brin de l'hairpin est composée de cinq thymidines.

Les sondes *EcoRI* et *PstI* ne possèdent pas de lésion mais respectivement le site de restriction des enzymes *EcoRI* et *PstI*. Ces sondes seront utiles pour réaliser la preuve de concept puis serviront de témoins négatifs, non substrats des enzymes de la BER.

Les sondes *Ino1* et *Ino2* contiennent la lésion inosine, issue de la désamination par hydrolyse de la base adénine (formant la base hypoxanthine, cf. annexe 1). Cette lésion est reconnue par la glycosylase Alkyle adénine glycosylase (Aag), enzyme monofonctionnelle qui excise la base lésée (cf. annexe 3). Une AP-endonucléase coupe ensuite au niveau du phosphate en 5' du site abasique néo-formé, libérant un fragment fluorescent de 31 nucléotides (pour *Ino1*) ou de 8 nucléotides (pour *Ino2*). Ces deux configurations de sondes, portant la lésion inosine, ont été synthétisées afin de pouvoir comparer l'efficacité des tests enzymatiques en fonction de la position de la lésion ainsi que la dégradation des sondes en présence d'extraits nucléaires.

La sonde *THF* contient un résidu tétrahydrofurane remplaçant une thymidine dans le site de restriction de *PstI*. Ce motif est un analogue stable et moins réactif du site AP (cf. annexe 1). Il a été démontré que ce motif est reconnu efficacement par les AP-endonucléases¹³. Après action de cette enzyme un 7-mère fluorescent est libéré (cf. annexe 3).

1.2 Contrôle qualité

Le contrôle des sondes implique la vérification de la pureté de celles-ci (cf. analyses réalisées annexe 4) mais aussi et surtout de leur fonctionnalité. Cette dernière a été validée en incubant 1 pmol des ODN *PstI*, *EcoRI* et *Ino1*, préalablement hybridés, avec diverses enzymes adéquates générant une coupure (cf. annexe 4). Les mélanges réactionnels ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). Il apparaît que les sondes *EcoRI* et *PstI* sont effectivement coupées par les enzymes de restriction correspondantes. De même, nous avons confirmé que la lésion inosine n'entrave pas l'activité de coupure d'*EcoRI*, observation déjà rapportée dans la littérature¹⁴.

2. Immobilisation des sondes nucléiques sur billes

Le principe du test consiste à détecter une activité de réparation par excision (coupure) à partir de sondes d'ADN supportées. La détection se fait par un changement de la localisation de la fluorescence, qui passe des billes (ODN greffés), au surnageant après l'étape de coupure. Ainsi il est nécessaire de greffer initialement les sondes de façon irréversible dans les conditions de manipulation, sur un support solide. Nous nous sommes donc tournés vers un support sous forme de billes magnétiques micrométriques (2,8 μm de diamètre).

D'une part ces billes sont recouvertes d'une monocouche de streptavidine. Cette protéine a une très forte affinité pour la biotine ($K_{\text{affinité}} = 10^{15} \text{ M}^{-1}$). L'interaction entre la biotine et la streptavidine ne peut être rompue que dans des conditions extrêmes, souvent dénaturantes. Le linker assure l'accessibilité du substrat aux enzymes. D'autre part ces billes sont composées d'un cœur ferromagnétique qui permet leur sédimentation rapide et spécifique grâce à un aimant (portoir magnétique destiné à cet usage). Cette propriété est très intéressante car elle autorise le lavage des billes et le changement des conditions d'incubation des billes au cours des tests biochimiques (par exemple du tampon enzymatique pour une digestion secondaire par une autre enzyme).

Dans un premier temps il a été nécessaire de déterminer la quantité de billes à utiliser pour optimiser l'immobilisation des sondes. Pour cela 10 pmol de l'ODN *Ino1* (hybridée sous forme « hairpin ») ont été incubées avec des quantités croissantes de billes. La fluorescence restant dans le surnageant, déterminée à l'aide d'un spectrofluorimètre en goutte ND-3300, permet d'accéder à la concentration en Cy3 présente dans le surnageant et donc d'en déduire à la quantité d'ODN fixée sur les billes (Figure 5A).

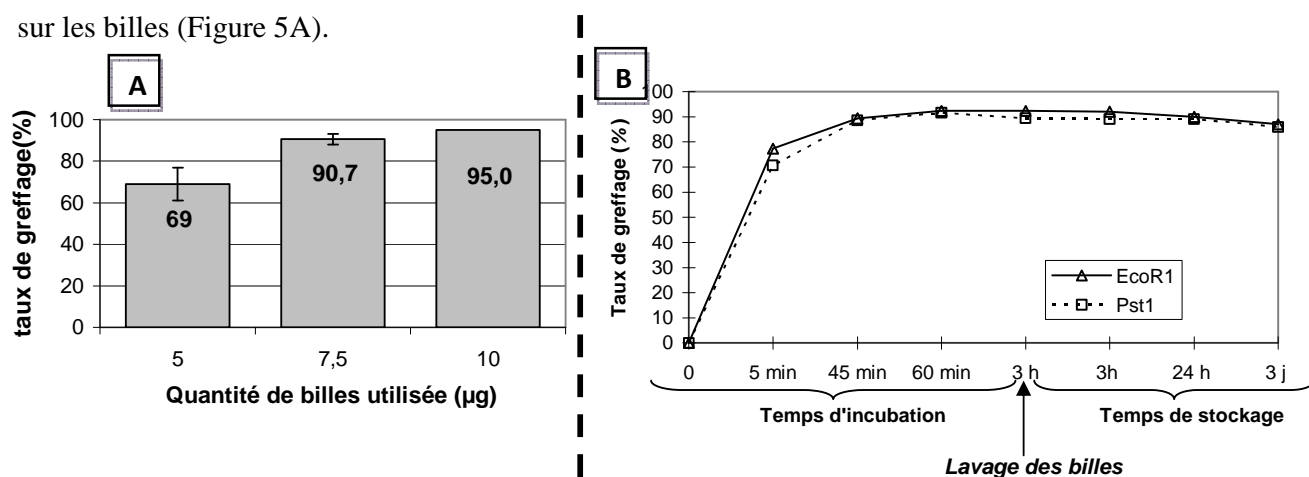


Figure 5 : **A)** Taux de greffage de 10 pmol d'ODN *Ino1* en fonction de la quantité de billes utilisée (incubation 1h à 25°C) ; **B)** Taux de greffage de 10 pmol d'ODN *Pst1* et *EcoR1* sur 7,5 μg de billes en fonction du temps d'incubation puis de stockage.

On observe que le taux de fixation pour 7,5 μg de billes est inférieur de seulement 4 % au taux de fixation obtenu pour 10 μg de billes. Ainsi, il a été choisi, pour la suite des expériences, d'utiliser 7,5 μg de billes pour immobiliser 10 pmol d'ODN.

On a ensuite déterminé le temps d'incubation des billes adéquate et vérifié que l'interaction streptavidine/biotine était stable lors du stockage, en mesurant la fluorescence du surnageant à différents temps d'incubation et de stockage (après le lavage). Il apparaît que le taux de greffage maximum ($\approx 90\%$) est atteint après 45 minutes d'incubation des ODN avec les billes (Figure 5B). D'autre part, après 24 heures de stockage, moins de 2 % des ODN greffés sont relargués en solution et entre 3 et 5 % après 72 heures, ce que nous pouvons considérer comme négligeable.

Afin de valider ce dispositif, il a fallu vérifier que les sondes supportées étaient fonctionnelles et que le signal était suffisamment intense pour être détecté. En effet, on pourrait imaginer que le fragment d'ADN interagisse non spécifiquement avec la surface de la bille et soit alors moins accessible aux enzymes. Dans un premier temps 1 pmol de l'ODN *PstI*, sur billes et en solution, a été digérée par 10 unités (u) d'enzyme de restriction correspondante, puis le surnageant a été analysé par PAGE (Figure 6). Il s'avère que l'intensité du signal de fluorescence correspondant au produit de coupure est sensiblement la même que ce soit sur billes ou en solution. Ceci valide donc la fonctionnalité des sondes supportées sur les billes magnétiques. De plus, ceci montre qu'il est possible de prélever une quantité donnée d'ODN greffés et donc de réaliser une analyse quantitative précise.

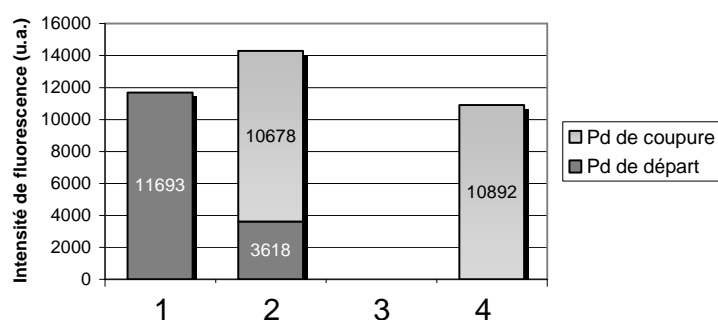


Figure 6 : Analyse par PAGE de la coupure de 1pmol la sonde *PstI* par l'enzyme de restriction

1. En solution sans enzyme
2. En solution avec 10 u *PstI*
3. Sur billes sans enzyme
4. Sur billes avec 10 u *PstI*

3. Activité enzymatique de l'Aag et des AP-endonucléases de la BER

Comme énoncé précédemment, l'objectif de ce travail est la mise au point d'un nouvel outil pour la détection d'une activité spécifique de la réparation de l'ADN. Aussi les sondes *Ino1* et *Ino2* ont été conçues afin de détecter l'initiation de la réparation par excision de base, plus précisément l'étape d'excision de l'hypoxanthine par l'Aag pour générer un site abasique. Cette première étape est suivie par la libération d'un fragment d'ADN fluorescent par l'action d'une AP-endonucléase qui clive le site abasique néo-formé en 5' de celui-ci. Plusieurs conditions doivent donc être remplies pour permettre la coupure et la détection du fragment nucléique: la lésion doit être accessible aux enzymes, ce qui a été démontré dans le paragraphe précédent. Enfin c'est l'action conjointe des deux enzymes qui permet la coupure du brin nucléique et sa détection, ce qui implique que les deux enzymes doivent être actives dans les conditions de réaction.

3.1 Détection d'une activité de réparation à partir d'enzymes purifiées

Dans un premier temps, des expériences ont été réalisées avec des enzymes purifiées afin de s'assurer de la fonctionnalité et de la performance du test. Ainsi nous avons réalisé la digestion conjointe de l'ODN *Ino1* par les deux enzymes ciblées, Aag et hAPE. 1 pmol de billes *Ino1* a été incubée avec une quantité croissante d'Aag, la quantité d'hAPE étant en excès, fixée à 2.5 unités. D'après les Figures 7A et 7B il apparaît que la coupure est maximum dès 0,25 unité d'Aag pour une pmol d'ODN substrat. Le même test a été réalisé avec l'enzyme Aag de souris en utilisant une quantité plus petite d'enzyme. La coupure est également maximale entre 0,1 et 0,5 u d'Aag de souris.

A noter la mise en évidence d'un phénomène intéressant pour les grandes quantités d'Aag: lors de l'utilisation de 5 u d'Aag pour 2,5 u d'hAPE, on observe un taux de coupure plus faible que pour une quantité d'Aag inférieure. Ceci s'explique par le fait que l'Aag possède une affinité non négligeable pour le site abasique nouvellement formé auquel elle reste fixée. C'est le déplacement de l'Aag par l'AP-endonucléase qui induit le clivage du site abasique. Ainsi, utiliser une trop grande quantité d'Aag, par rapport à l'hAPE, entraîne un déplacement de l'équilibre vers la fixation de l'Aag à son produit empêchant de ce fait la coupure du site abasique par l'APendo¹⁵.

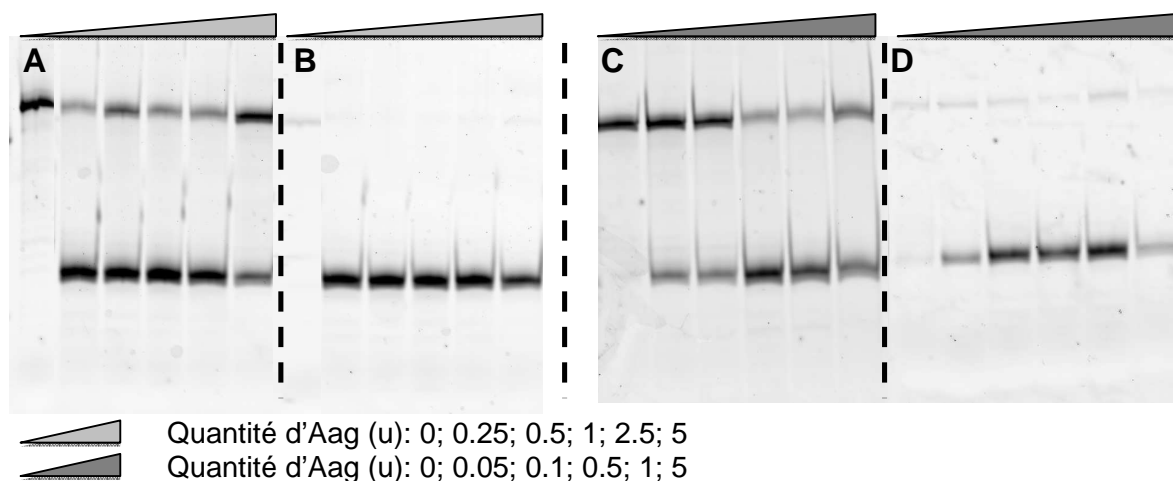


Figure 7: Digestion conjointe de 1 pmol de la sonde *Ino1* A) en solution par une gamme d'Aag humaine et 2,5 u d'hAPE purifiées ; B) sur billes par une gamme d'Aag humaine et 2,5 u d'hAPE purifiées ; C) en solution par une gamme d'Aag de souris et 2,5 u d'hAPE purifiées ; D) sur billes par une gamme d'Aag de souris et 2,5 u d'hAPE purifiées.

3.2 Détection d'une activité de réparation au sein d'un extrait nucléaire

Les premiers essais de détection de l'activité Aag/hAPE au sein d'extraits nucléaires ont été réalisés à partir de la lignée cellulaire HeLa.

Dans un premier temps il a fallu déterminer le tampon optimal pour réaliser la coupure de l'hairpin substrat par le système Aag/hAPE tout en minimisant la dégradation non spécifique de l'ADN. Dans cette optique des expériences préliminaires ont été menées afin de tester différents tampons enzymatiques.

Cette étude nous a renseignés sur plusieurs paramètres, importants pour visualiser efficacement l'activité de la BER au sein d'extraits nucléaires. Premièrement, il apparaît que la présence d'un cation divalent est indispensable pour l'activité catalytique de l'AP-endo. En effet, le cation magnésium est un cofacteur présent au sein du site catalytique de la protéine qui permet l'activation du substrat par modification conformationnelle de celui-ci¹⁶. Cependant il semble préférable d'utiliser le cation Zn^{2+} plutôt que Mg^{2+} , ce dernier étant aussi un cofacteur indispensable pour de nombreuses nucléases non spécifiques, ce qui favorise la dégradation des sondes nucléiques.

Le pH du tampon est également crucial : il s'avère que l'enzyme hAPE est très peu active à pH légèrement basique contrairement à l'Aag qui est aussi active à pH 7.5 qu'à pH 8.8.

Il est également intéressant de signaler que les tampons les plus efficaces contiennent généralement de la BSA. Il a été montré que cette protéine stabilise l'Aag, permettant d'augmenter le nombre de cycles catalytiques de l'enzyme¹⁷.

Suite à ces expériences, dont les principaux résultats sont exposés ci-dessus, le tampon optimal de digestion par des extraits nucléaires que nous avons utilisé est composé de 10 mM HEPES/KOH, 2 mM EGTA/KOH, 80 mM KCl, 0.1 mM $ZnCl_2$, 1 mM DTT et 0.5 mg/mL BSA.

Les ODN *Ino1*, *Ino2* et *EcoRI* greffés sur billes ont donc été incubés en présence de concentrations croissantes en extraits nucléaires de cellules HeLa. Les résultats des analyses par gels d'électrophorèse (PAGE) et de la lecture de fluorescence du surnageant des billes sont présentés en Figure 8.

D'après l'analyse par PAGE, la sonde témoin *EcoRI* est peu dégradée, même à de fortes concentrations en extraits cellulaires. On remarque aussi que la dégradation des sondes lésées *Ino1* et *Ino2* est plus importante. Ce phénomène est attribué à la dégradation du produit de coupure après excision de la lésion, ce dernier étant beaucoup plus exposé aux nucléases que la sonde intègre liée aux billes. Cependant on note que la sonde *Ino1* est plus dégradée que la sonde *Ino2*. Il semble donc que l'orientation de la sonde soit importante et que l'accrochage des oligonucléotides sur billes par l'extrémité 3' soit préférable (protection accrue vis-à-vis des 3'exonucléases majoritaires au sein des extraits).

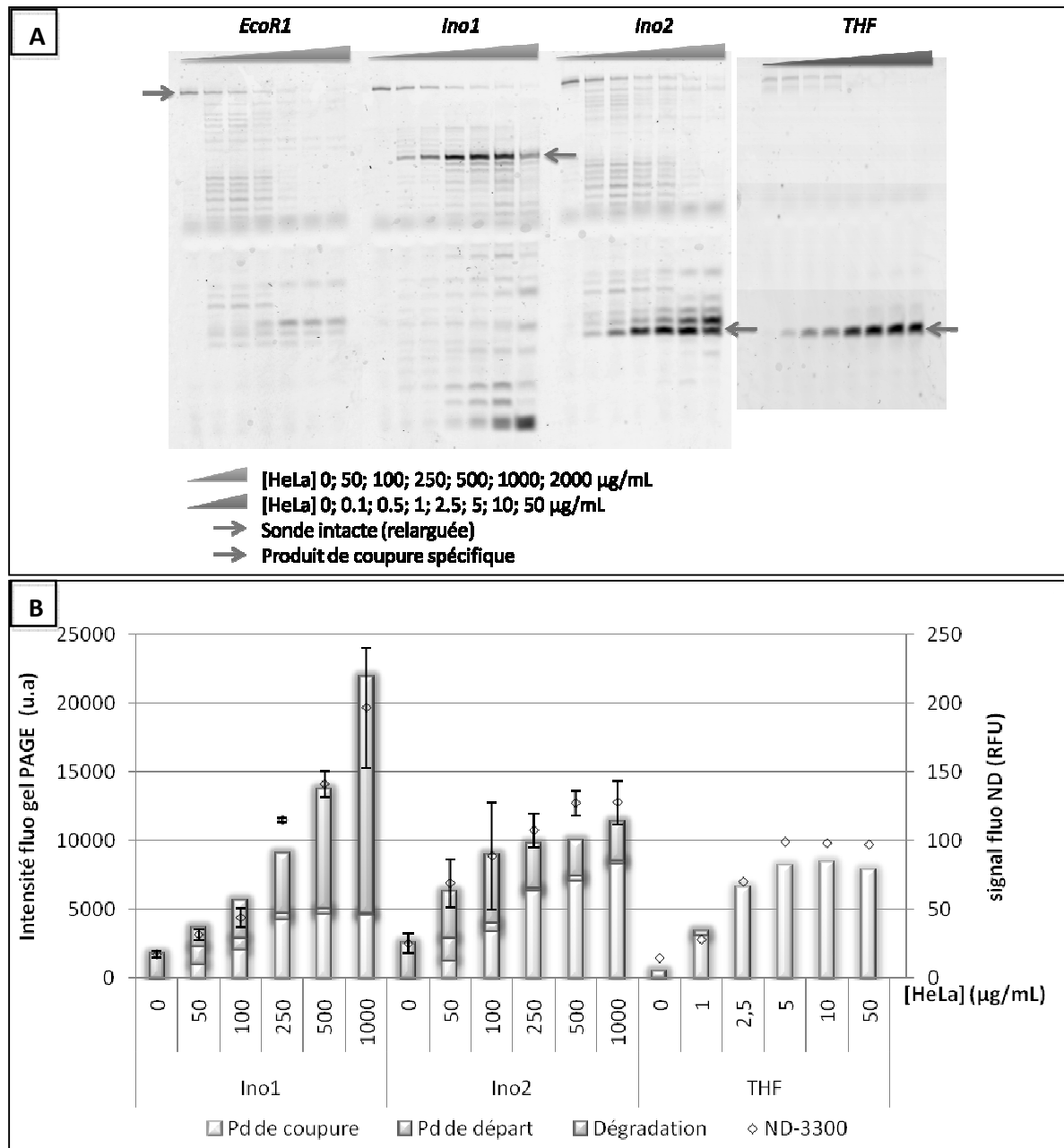


Figure 8 : Digestion des ODN *EcoR1*, *Ino1* *Ino2* et *THF* par des extraits nucléaires *HeLa* (1h à 37°C) A) Photo des gels PAGE; B) Analyse par PAGE de la coupure des sondes (histogramme) et de la fluorescence totale mesurée par spectrofluorimétrie à l'aide du Nanodrop ND-3300 (croix)

On observe que la coupure de la sonde est dépendante de la concentration en extraits dans la gamme de concentrations adéquate. Ainsi, la sonde *THF* est coupée beaucoup plus efficacement que les sondes *Ino1* et *Ino2* (coupure spécifique maximum à 50 µg/mL d'extrait pour la sonde *THF* et 500µg/mL pour les sondes *Ino1* et *Ino2*). Ceci peut s'expliquer d'une part parce que la coupure des sondes *Ino* nécessite l'action de deux enzymes (Aag puis hAPE) mais aussi parce que la glycosylase Aag est faiblement exprimée dans les cellules *HeLa*. La sonde *THF* est donc parfaitement adaptée à la mesure d'activité d'AP-endonucléases au sein d'extraits cellulaires. Concernant la sonde *Ino2*, il serait possible d'améliorer cette dernière, qui nécessite l'emploi de

plus grandes concentrations en extraits pour détecter efficacement l'activité de l'Aag, en la désensibilisant vis-à-vis des nucléases (par l'introduction de liens phosphorothioate par exemple)

Aussi cette expérience permet de valider le test mis au point ici et basé sur la mesure de la fluorescence totale par spectrofluorimétrie. En effet, le signal de fluorescence mesuré par le Nanodrop ND-3300 est en accord avec le taux effectif de coupure des hairpins lésées déterminé par PAGE. On note toutefois que le signal mesuré par spectrofluorimétrie en présence de grandes concentrations en extraits nucléaires (>1000 µg/mL) est sous-estimé. Une hypothèse peut être que la grande quantité de protéines interagit avec le faisceau d'excitation ou d'émission de fluorescence.

Il apparaît clairement que pour 500 µg/mL et pour 50 µg/mL d'extrait HeLa, on obtient le meilleur rapport taux de coupure/dégradation pour les sondes *Ino* et *THF* respectivement. Il a donc été choisi d'utiliser ces concentrations afin d'analyser l'activité de réparation des sondes *Ino1* et *THF* dans différents extraits nucléaires d'une lignée de cellule neuronale cancéreuse (glioblastome humain) : U373-IV3 DN et U373-IV3 TMZ. La notation IV3 signifie que la tumeur a été implantée 3 fois dans le cerveau de souris. La lignée TMZ est connue pour être résistante au témozolomide. Cette molécule organique est un agent méthylant utilisé dans le traitement de certains cancers. Les résultats de l'analyse des surnageants par spectrofluorimétrie sont présentés dans la Figure 9.

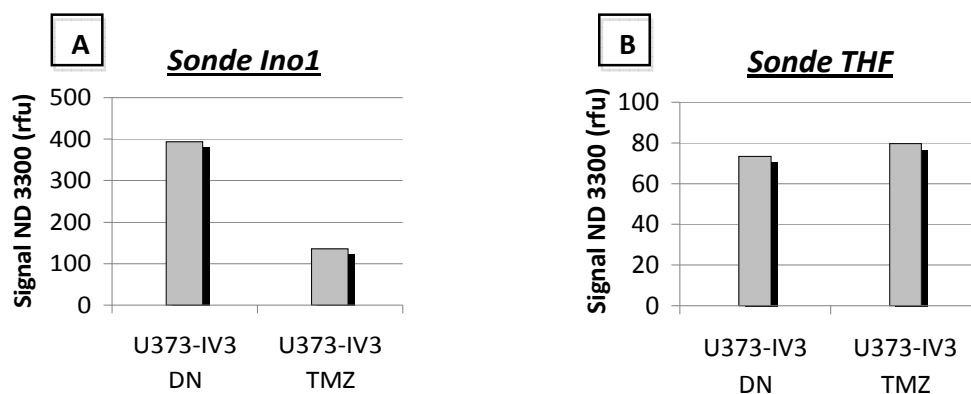


Figure 9 : Digestion de 1 pmol d'ODN par les extraits nucléaires U373-IV3 DN et TMZ **A)** Sonde *Ino1* incubée avec 500 µg/mL d'extraits **B)** Sonde *THF* incubée avec 50 µg/mL d'extraits.

On observe que la fluorescence totale après coupure de la sonde *THF* est identique dans les deux extraits (Figure 9B). Par ailleurs, la sonde *Ino1* est environ 3 fois moins coupée lorsqu'elle est incubée en présence de l'extrait U373- IV3 TMZ par rapport à la digestion avec l'extrait DN (Figure 10A). Ceci suggère que l'activité d'excision de la lésion inosine par l'enzyme Aag est moins importante dans cet extrait. Concernant l'enzyme hAPE, celle-ci conserve une activité similaire dans les deux extraits. Toutefois, cette expérience doit être reproduite pour vérifier la répétabilité et la reproductibilité de ces résultats. En conclusion, il apparaît que ce nouveau type de sondes immobilisées sur billes magnétiques, et le test fluorescent associé, permettent de mesurer, de

manière directe, efficace et rapide une différence d'activité enzymatique (ADN glycosylase et AP-endonucléase de la BER) au sein de plusieurs extraits cellulaires complexes.

4. Inhibition de l'activité AP-endonucléase par la méthoxyamine

La méthoxyamine (Mx) est une petite molécule organique capable d'inhiber l'action des AP-endonucléases en réagissant avec le substrat de ces enzymes, le site abasique¹⁸. La fonction amine de l'inhibiteur réagit avec la fonction aldéhyde du 2'-désoxyribose non cyclique du site AP (en équilibre avec la forme cyclique hémiacétal) conduisant à la formation d'un éther d'oxime. (cf. annexe 3). L'adduit Mx/site AP est un intermédiaire stable réfractaire à l'activité lyase de l'AP-endonucléase.

Nous avons donc voulu vérifier que notre système de sondes d'ADN fluorescentes sur billes permettait de visualiser cette inhibition directement au sein d'extraits nucléaires. Pour ce faire les sondes *Ino1*, *Ino2* et *THF* ont été incubées avec 500 µg/mL d'extraits nucléaires HeLa en présence d'une concentration croissante en Mx.

Les résultats obtenus (Figure 10) nous montrent qu'effectivement, l'initiation de la réparation de la lésion inosine est inhibée par la Mx et que cette inhibition est directement corrélée à la concentration en Mx. Aussi le fait que la sonde THF soit coupée dans les mêmes proportions en présence ou non de Mx prouve le mécanisme d'action de cette molécule. En effet le cycle THF est un éther cyclique stable tandis que le site abasique généré par l'action des glycosylases est un hémiacétal en équilibre avec une forme ouverte aldéhydrique. C'est justement cet aldéhyde qui réagit avec l'alcoxyamine pour mener à la formation d'un éther méthylique d'oxime, bloquant l'action de l'AP-endonucléase. La sonde THF ne réagit donc pas avec la Mx qui, par conséquent, n'inhibe pas l'action de l'AP-endonucléase vis-à-vis de ce substrat.

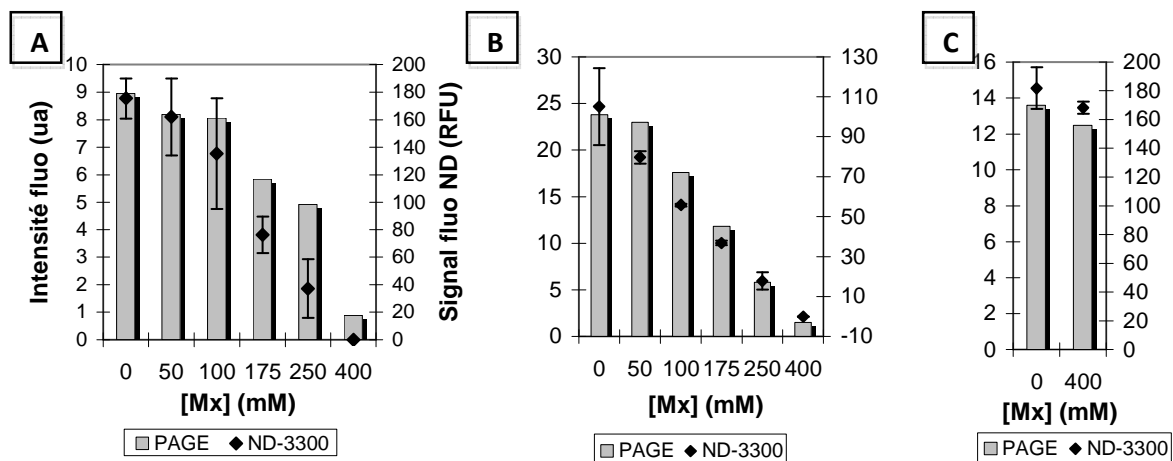


Figure 10 : Digestion de 1 pmol d'ODN par 500 µg/mL d'extrait nucléaire HeLa en présence d'une concentration croissante en Mx (mM) : analyse comparée par PAGE et par spectrofluorimétrie. A) Sonde *Ino1* ; B) Sonde *Ino2* ; C) Sonde *THF*.

III. Conclusion/ Perspectives

Au cours de ce stage, nous avons mis au point un dispositif performant qui permet l'étude de la fonctionnalité d'enzymes de la réparation de l'ADN. Le projet a été ciblé sur deux enzymes majeures de la réparation par excision de base : une ADN-glycosylase, Aag et une AP-endonucléase, hAPE. L'outil se caractérise par une sonde d'acide nucléique lésée, autoccomplémentaire (structure « hairpin »), immobilisée sur des billes magnétiques (de 2,8 μm de diamètre) par une interaction streptavidine/biotine. Dans un premier temps nous avons démontré que les sondes ADN possédant les séquences et la structure appropriées peuvent être coupées efficacement par des enzymes de restriction. Nous avons montré par la suite que ce système permet également de mesurer l'activité et l'inhibition d'enzymes de réparation présentes dans des extraits cellulaires, de façon **rapide, spécifique, quantitative** et **sensible** (<1 pmol d'ODN substrat). Lorsque la sonde est reconnue et coupée par une enzyme spécifique, un signal fluorescent apparaît dans le surnageant. Nous avons montré qu'il est possible de mesurer ce signal dans un volume réduit grâce à un spectrofluorimètre en goutte (échantillons de 2 μL) permettant une miniaturisation du test. Le signal mesuré est directement proportionnel à la quantité de lésion reconnue et excisée. Nous avons également vérifié par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, couplée à une détection fluorescente, que le signal mesuré par le spectrofluorimètre correspond au produit de coupure spécifique.

Des travaux sont actuellement menés pour étendre cet outil à la détection d'autres activités de réparation. Une sonde a été synthétisée comportant la lésion $O^6\text{MeGua}$ à la place d'une guanine dans le site de restriction de l'enzyme PstI. Il a été montré que cette lésion alkylée empêche la coupure du double brin par l'enzyme de restriction¹⁹. Cette propriété pourrait permettre de quantifier l'activité de l'enzyme qui répare la lésion O^6 -méthylguanine par réversion directe (RR), la Méthyle Guanine Méthyle Transférase (MGMT). Une pré-incubation de la sonde lésée avec cette protéine permettrait la restauration du site de restriction. Une seconde digestion avec l'enzyme PstI conduirait à la coupure des sondes réversées uniquement, générant un signal de fluorescence dépendant donc indirectement de la quantité de MGMT fonctionnelle. C'est dans cette optique que les sondes sur billes magnétiques ont un grand intérêt : elles permettraient un changement aisé et rapide de tampon enzymatique entre les deux digestions par simple culottage des billes.

Il est aussi envisagé d'utiliser ce type de sondes supportées pour faire du multiplexage, c'est-à-dire immobiliser des sondes comportant différentes lésions associées à différents fluorophores pour mesurer l'activité de plusieurs enzymes spécifiques au sein d'un seul échantillon.

Ce dispositif peut être également développé pour d'autres applications. L'une d'entre elles serait de fonctionnaliser les billes avec des sondes lésées initialement quenchées (par l'introduction d'un quencher de fluorescence en face du fluorophore dans la conformation « hairpin »). On peut

ainsi imaginer pouvoir « éclairer » les billes, après clivage de la sonde par une enzyme (de réparation ou autre). Par cette méthode on peut pareillement envisager de faire du multiplexage en sondant les mêmes échantillons (extraits cellulaires par exemple) avec des billes fonctionnalisées par différents oligonucléotides (une lésion pour un fluorophore). Les billes peuvent ensuite être triées en fonction de la longueur d'onde émise par un système de type Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS).

IV. Matériel et Méthodes

1. Synthèse des oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés ont été synthétisés à l'échelle de 1 ou 0,5 micromole avec un synthétiseur automatique d'acides nucléiques (*Applied Biosystems 392 DNA/RNA Synthesizer*). La synthèse a été effectuée selon la voie phosphoramidite sur support solide : cette technique permet de s'affranchir des étapes d'isolement et de purification des intermédiaires oligonucléotidiques. En effet le support silice*, insoluble dans les solvants organiques, est fonctionnalisé par le premier nucléotide fixé par sa fonction 3'. Dans le cas des oligonucléotides contenant un groupement biotine en 3', le monomère utilisé est le *BiotinTEG CPG support* (Société *Glen Research*). Ensuite l'addition séquentielle des monomères (*dA, dG, dC, dT-3'-CE Phosphoramidite* de la Société *Glen Research*) en solution dans l'acétonitrile permet l'élongation de la séquence de l'extrémité 3' vers 5'. Le support est simplement lavé puis séché entre chaque cycle afin d'éliminer les excès de réactifs.

Le cycle de condensation de la méthode au phosphoramidite se décompose en 5 étapes : la détritylation de la fonction alcool en 5', l'activation du monomère phosphoramidite couplée à la condensation, le « capping » des fonctions 5'-OH n'ayant pas réagi et l'oxydation du phosphite en phosphate.

Le premier motif est détritylé par une solution d'acide trichloroacétique à 2% dans du dichlorométhane libérant ainsi l'alcool primaire (extrémité 5'). Le nucléotide suivant protégé, sous forme de synthon phosphoramidite, est activé par le tétrazole ce qui permet concomitamment l'étape de condensation. Le phosphore trivalent formé étant peu stable, celui-ci est oxydé par une solution d'iode à 0,1 M dans un mélange eau/pyridine/THF. Le cycle est terminé par le capping des fonctions 5'-OH qui n'auraient pas réagi par une solution d'anhydride phénoxyacétique (car les amines exocycliques de la guanine et de l'adénine sont protégées par un groupement phénoxyacétyl) et de méthyle imidazole dans du THF. Le cycle est ainsi répété autant de fois que nécessaire afin d'obtenir la séquence désirée.

* Le support solide est introduit dans la colonne de réaction. A chaque étape, les solutions de réactifs ou de lavage sont pompées au travers de cette colonne. Celle-ci est reliée à différentes lignes qui délivrent les réactifs ainsi qu'au synthétiseur. Chaque nucléotide est ajouté grâce à un moniteur qui contrôle le cycle de synthèse.

En fin de synthèse, les bases et les phosphates de l'oligonucléotide sont déprotégées et le fragment d'ADN est clivé du support par une solution d'hydroxyde d'ammonium à 30%, 16h à température ambiante. L'ammoniac est ensuite évaporé sous vide grâce au *Speedvac® SPD 111V*.

A noter que les nucléotides lésés ainsi que le fluorophore (*Cy3™ Phosphoramidite* de la société *Glen Research*) et la biotineTEG sont également introduits par voie chimique sous forme de synthons phosphoramidite ce qui permet de contrôler précisément leur position au sein de la séquence.

2. Purification des mélanges bruts de synthèse et caractérisation des oligonucléotides

Une fois en solution, les oligonucléotides ont été purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse sur une colonne *Hypersil® HS C18* montée sur une pompe *MERK® L6200*. Les différents fragments d'ADN sont séparés par un gradient linéaire d'acétonitrile dans du TEAA 10 mM. La détection des fragments d'ADN se fait grâce à un détecteur UV *MERK® L400* à 260 nm. Les fractions récupérées sont ensuite concentrées sous vide au *Speedvac®* pour éliminer l'acétonitrile puis sont séchées au lyophilisateur. Elles sont reprises dans de l'eau milliQ puis dosées par mesure de l'absorbance à 260 nm grâce à un spectrophotomètre en goutte *Nanodrop ND-1000*. La pureté des fractions obtenues est contrôlée suivant plusieurs techniques complémentaires (voir ci-dessous).

2.1 Analyse par HPLC

Chaque fraction est analysée par HPLC analytique sur un appareil *Agilent Technologie® 1200 Series* muni d'un détecteur UV et d'un fluorimètre. La pureté de l'oligonucléotide est relative d'une part à la présence d'un pic unique (A_{260}) mais aussi au rapport entre le signal d'absorbance à 260 nm et le signal de fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}}=546$ nm et $\lambda_{\text{émission}}=563$ nm).

2.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'avantage de ce type de spectrométrie de masse est qu'elle permet de détecter l'ion pseudo-moléculaire pour des longs oligonucléotides (supérieurs à 15 bases de long), de par sa méthode d'ionisation douce. De plus c'est une méthode très sensible qui nécessite l'utilisation d'une dizaine de picomoles d'oligonucléotide. Ce dernier est préalablement dessalé grâce à une résine échangeuse d'ions de type *Dowex™ (50WX8 100-200* sous forme H^+). Cette résine est au préalable échangée sous forme NH_4^+ en laissant les billes dans une solution 0.1 M d'acétate d'ammonium et en la laissant sécher à l'air une nuit après l'avoir rincée avec de l'isopropanol. La cible est lavée au citrate d'ammonium 100 mM dans un bac à ultrasons. 10 μ L de l'échantillon à analyser sont ensuite déposés sur les billes, en laissant l'échange opérer durant 10 minutes. 1 μ L de l'échantillon dessalé

est prélevé et déposé sur la cible auquel on ajoute sans mélanger 1 μL de matrice. L'appareil est ensuite calibré avec un oligonucléotide de masse connue et l'analyse de l'échantillon est réalisée lorsque les cristaux sont formés à la surface de la cible.

Tous les oligonucléotides synthétisés ont été analysés par spectrométrie de masse. Le pic m/z expérimental est en accord avec la masse calculée des fragments d'ADN et ceci pour tous les substrats précédemment mentionnés.

2.3 Analyse des séquences par électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les oligonucléotides ont été déposés sur un gel de polyacrylamide après avoir été incubés avec ou sans les enzymes spécifiques soit de la lésion, soit du site de restriction inséré dans les différentes sondes. La solution d'acrylamide utilisée est préparée comme suit : 210 g d'urée sont dissout à chaud dans 250 mL d'acrylamide à 40% et 50 mL de tampon Tris/Borate/EDTA (TBE 10X de chez *Invitrogen*TM). La solution est complétée à 500 mL avec de l'eau milliQ puis et finalement filtrée sur fritté.

Les plaques de verre sont lavées avec du détergeant puis à l'eau et enfin à l'éthanol avant leur utilisation. Les faces intérieures sont traitées avec une solution de diméthylchlorosilane à 10% dans du dichlorométhane. Cette étape permet de limiter les interactions du gel avec le verre afin de faciliter son démoulage final. Les espaceurs et le peigne sont également lavés à l'eau et à l'éthanol.

La polymérisation du gel est initiée en ajoutant 700 μL de solution de persulfate d'ammonium (APS) à 10% puis 70 μL de TEMED pour 100 mL de la solution d'acrylamide à 20%.

Une fois coulé et polymérisé, le gel est placé en pré-migration à 1000 V en limitant la puissance à 3 W. Les échantillons, préalablement dénaturés par chauffage à 90°C pendant 2 minutes dans 3 μL de « bleu formamide » (90% formamide, 0,02% xylène cyanole, 0,02% bleu de bromophénol), sont ensuite déposés dans les puits. La migration des fragments d'ADN se fait à 1900 V en limitant la puissance entre 7 et 12 W. Le tampon de migration utilisé est une solution de TBE 1X. Après la migration, le gel est analysé à l'aide d'un scanner de fluorescence *Typhoon*TM de chez *GE Healthcare*.

3. Hybridation des oligonucléotides (formation des duplexes hairpins)

Les fragments d'ADN autoccomplémentaires nécessitent d'être placés en milieu salin pour permettre l'hybridation et la formation de la structure en double brin, sans laquelle il ne peut y avoir coupure. Ainsi le cycle d'hybridation est réalisé comme suit : l'oligonucléotide est repris dans une solution aqueuse (eau milliQ) du tampon 1X utilisé pour l'expérience qui suit. La concentration en oligonucléotide est de 1 μM finale. L'échantillon est chauffé à 90°C pendant 3 minutes puis subit

un refroidissement lent jusqu'à la température ambiante pour empêcher la formation de sous structures non désirées.

4. Immobilisation des sondes nucléiques sur billes Dynabeads® M280-Strepta

Les billes magnétiques utilisées sont fournies par la société *Invitrogen*TM. Ces billes ont un diamètre de 2,8 μm et sont recouvertes d'une monocouche de streptavidine d'où leur nom, *Dynabeads® M280-Strepta*.

4.1 Préparation des billes

Le flacon de stockage est vortexé vigoureusement pour homogénéiser la suspension de billes. Les billes sont prélevées (1 volume), transvasées, dans un eppendorf®. Le tube est placé sur un portoir magnétique (*Dynal MPC®-E*). Le surnageant est retiré. Le tube est retiré du portoir magnétique. Les billes sont lavées trois fois avec 1 volume de « Washing solution » fournie dans le kit *Dynal® Kilobase Binder*TM (en resuspendant, culotant les billes et retirant le surnageant à chaque fois). Elles sont ensuite lavées avec 1 volume de « Binding solution 2X » fournie dans le même kit. Les billes sont ensuite resuspendues dans 2 volumes de « Binding solution » et 2 volumes d'eau milliQ.

4.2 Préparation de la solution d'oligonucléotide et immobilisation sur billes

En parallèle est préparée une solution de l'oligonucléotide à greffer dans 2 volumes de « Binding solution » et 2 volumes d'eau milliQ. Les ODN subissent préalablement un cycle d'hybridation. Cette solution est ajoutée sur la suspension de billes. Le tube est placé 1 heure à 25°C sous légère agitation. Les billes sont culottées et le surnageant prélevé. La concentration en ODN non immobilisés est déterminée par lecture de la fluorescence du Cy3 contenue dans le surnageant grâce au spectrofluorimètre en goutte (*Nanodrop ND-3300* de chez *Thermo Scientific*). Une courbe de calibration permet ainsi de déterminer la quantité d'ODN non fixée sur les billes et donc indirectement d'accéder à la quantité réelle d'ODN immobilisée.

4.3 Conditionnement des billes fonctionnalisées

Les billes sont lavées 3 fois avec 8 volumes de « Washing solution », 1 fois avec de l'eau milliQ puis sont conditionnées dans le tampon désiré. Après 3 heures de stockage à 4°C, le surnageant est retiré une dernière fois pour déterminer la quantité d'ODN libérée en solution (interactions non spécifiques) par lecture de la fluorescence au spectrofluorimètre en goutte. Les billes sont enfin suspendues dans le tampon désiré (5 μL pour 1 pmol d'ODN immobilisée) et sont prêtes à être utilisées.

5. Digestions enzymatiques

Chaque digestion enzymatique est réalisée à partir d'1 pmol d'ODN en solution à 1 μ M - ayant subi un cycle d'hybridation dans le tampon adéquate- ou d'1 pmol d'ODN immobilisée sur billes. Dans ce dernier cas 5 μ L (1 pmol) du stock de billes fonctionnalisées sont transvasés dans un tube eppendorf®. Les billes sont culottées sur portoir magnétique puis le surnageant est retiré.

5.1 Par les enzymes purifiées

<u>Enzyme</u>	<u>Provenance</u>	<u>Tampon utilisé</u>
<i>Aag humaine</i> (10 u/ μ L)	Société New England Biolabs®	10 mM HEPES-KOH; 100mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; pH=7.4
<i>Aag de souris</i> (10 u/ μ L)	Société Trevigen®	
<i>hAPE</i> (2.5 u/ μ L)	Société Trevigen®	
<i>EcoRI</i> (10 u/ μ L)	Société Trevigen®	50mM Tris-HCl (pH 8.0) ;10mM MgCl ₂ ;100mM NaCl
<i>PstI</i> (10 u/ μ L)	Société Invitrogen®	50mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM NaCl

Tableau 1 : Enzymes purifiées et tampons commerciaux utilisés

Sont ensuite ajoutés dans l'ordre : le tampon enzymatique, l'eau milliQ et enfin la (les) enzyme(s) pour un volume final de 10 μ L (cf. Tableau 1). Les échantillons sont incubés 1h à 37°C (sous agitation pour les digestions des ODN sur billes). Le surnageant des billes est prélevé en fin de réaction pour une lecture de fluorescence au spectrofluorimètre en goutte. Les fragments libérés sont finalement analysés par PAGE. Des analyses complémentaires (spectrométrie de masse MALDI-TOF) ont aussi été réalisées.

5.2 Par des extraits nucléaires

Sont ajoutés dans l'ordre: le tampon C de digestion, l'eau milliQ et la solution d'extraits nucléaires à tester pour un volume final de 10 μ L. Les échantillons sont incubés 1h à 37°C (sous agitation pour les digestions des ODN sur billes). Le surnageant des billes est prélevé en fin de réaction pour une lecture de fluorescence au spectrofluorimètre en goutte. Les fragments libérés sont finalement analysés par PAGE. Des analyses complémentaires en spectrométrie de masse MALDI-TOF ont aussi été réalisées. A noter que dans ce cas les échantillons sont purifiés et concentrés au préalable par chromatographie sur Zip-Tip (société Waters™).

V. Bibliographie

1. Friedberg, E.C., et al., DNA Damage, in *DNA Repair and Mutagenesis*. **2006**, ASM Press. 9-69.
2. Gates, K. S., An overview of chemical processes that damage cellular DNA, **2009**, *Chem. Res. Toxicol*, *22*, 1747-1760.
3. Schärer, Orlando D., Chemistry and biology of DNA repair. **2003**, *Angewandte Chemie- International Ed.*, *42*, 2946-2974.
4. Hoeijmakers, J.H.J., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **2001**, *Nature*. *411* 366-374.
5. Pourquier P., La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. **2006**, *Bull Cancer* ; hors série : 124-144.
6. Wang D, Xiang DB, Yang XQ, Chen LS, Li MX, Zhong ZY, et al. APE1 overexpression is associated with cisplatin resistance in non-small cell lung cancer and targeted inhibition of APE1 enhances the activity of cisplatin in A549 cells. **2009** *Lung Cancer*; *66*, 298–304
7. Abbotts R., Madhusudan S., Human AP endonuclease 1 (APE1): From mechanistic insights to druggable target in cancer. **2009**, *Cancer Treatment Reviews*, *12*.006
8. Chollat-Namy, A., Gasparutto, D., Cadet, J., Favier, A., Nucleic acid biosensors for real-time monitoring of DNA repair activities by FRET. **2005**, *Chemistry of Nucleic Acid Components*, *7*, 397-399
9. Sauvaigo, S., V. Guerniou, et al. An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. **2004** *Anal Biochem*, *333*, 182-92.
10. Thèse d'Alexia Chollat-Namy au Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques /SCIB/INAC/DCM/CEA Grenoble, Nouvelles sondes nucléiques pour la mesure d'activités enzymatiques de réparation des dommages de l'ADN par un test de fluorescence, **2006**. Gasparutto, D; Cadet, J; Dépôt de brevet "Use of oligonucleotides for detection of DNA lesion repair activity", **2003**.
11. Li, J.J., Geyer, R., & Tan, W., Using molecular beacons as a sensitive fluorescence assay for enzymatic cleavage of single-stranded DNA. **2000**, *Nucleic Acids Res*, *28*, E52.
12. Kundu, L.M., Burgdorf, L.T., Kleiner, O., Batschauer, A., & Carell, T. Cleavable substrate containing molecular beacons for the quantification of DNA-photolyase activity. **2002** *Chembiochem*, *3*, 1053-60.
13. D.M Wilson III, M Takeshita, A.P Grollman and B Demple, Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape1) at abasic site analogs in DNA. **1995**, *J. Biol. Chem*, *270*, 16002–16007
14. Doi, A., S. P. Pack, et al. Reinvestigation of the molecular influence of hypoxanthine on the DNA cleavage efficiency of restriction endonucleases BglII, EcoRI and BamHI. **2009**, *J Biochem*, *146*, 201-
15. Maher, R. L., Vallur, A. C., Feller, J. A., and Bloom, L. B. Slow base excision by human alkyladenine DNA glycosylase limits the rate of formation of AP sites and AP endonuclease 1 does not stimulate base excision, **2007** *DNA Repair*, *6*, 71–81
16. Erzberger, J. P., Wilson, D. M. The Role of Mg²⁺ and Specific Amino Acid Residues in the Catalytic Reaction of the Major Human Abasic Endonuclease: New Insights from EDTA-resistant Incision of Acyclic Abasic Site Analogs and Sitedirected Mutagenesis. **1999** *J. Mol. Biol*, *290*, 447–457
17. Michael R. Baldwin and Patrick J. O'Brien Human AP Endonuclease 1 Stimulates Multiple-Turnover Base Excision by Alkyladenine DNA Glycosylase. **2009**, *Biochemistry*, *48*, 6022–6033
18. Liuzzi M., Weinfeld M., C. Paterson I M. Selective Inhibition by Methoxyamine of the Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Activity Associated with Pyrimidine Dimer-DNA Glycosylases from *Micrococcus luteus* and Bacteriophage T4. **1987** *Biochemistry*, *26*, 33 15-332 1
19. Green C.,Loechler E.,Kerry W. Fowler K, Essigmann J. Construction and characterization of extrachromosomal probes for mutagenesis by carcinogens: site-specific incorporation of O6-methylguanine into viral and plasmid genomes, **1984**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *81*,13-17.

Annexe C

Liste des communications scientifiques

Orales

“Biocapteurs à ADN pour l’analyse des systèmes de réparation : Conception et application de nouvelles sondes auto-complémentaires fluorescentes”. **Journée Rhône-Alpes des biomolécules.** 3 juin 2010 (Grenoble, France)

“Sondes oligonucléiques pour la détection, sur support, de mésappariements et d’activités de réparation de l’ADN”. **Journée de l’école doctorale Chimie et sciences de vivant.** 16 Juin 2009 (Grenoble, France)

Poster

“Pulsed EPR structural analyses of DNA damages caused by platinum anticancer agents”. **8th winter research conferences on oxidative DNA damage.** 17-23 Janvier 2009 (Les Houches, France)

“Analyse structurale par RPE pulsée des lésions de l’ADN induites par les agents antitumoraux platinés” **4èmes Journées Scientifiques du CLARA.** 24 et 25 mars 2009 (Archamps, France)

“Oligonucleotide microarrays elaboration using a click chemistry approach : applications to mismatches and DNA repair activities detection”. **Ecole thématique du CNRS, Sciences de la miniaturisation et biologie.** 8-12 Juin 2009 (Grenoble, France)

“Oligonucléotide microarrays elaboration using click chemistry approach : Application to mismatches and DNA repair activities”. **European Environmental Mutagen Society Meeting.** 20-25 Août 2009 (Florence, Italie)

“Analyse de certains systèmes de la réparation de l’ADN par sondes hairpins sur support” **5èmes Journées Scientifiques du CLARA.** 30 et 31 Mars 2010 (Lyon, France)

“Oligonucleotide microarrays elaboration using a click chemistry approach : applications to DNA repair activities detection”. **20th world congress on biosensors.** 26-28 Mai 2010 (Glasgow, Royaume-Uni)

Publications scientifiques

CLAVÉ, G., VOLLAND H., FLAENDER, M., GASPARUTTO, D., ROMIEU, A., RENARD, PY. (2010). A universal and ready-to-use heterotrifunctional cross-linking reagent for facile synthetic access to sophisticated bioconjugates. *Org Biomol Chem*, 8(19) :4329-4345.

FLAENDER, M., SICOLI, G., FONTECAVE, T., MATHIS, G., SAINT-PIERRE, C., BOULARD, Y., GAMBARELLI, S., AND GASPARUTTO, D. (2008). Site-specific insertion of nitroxide-spin labels into DNA probes by click chemistry for structural analyses by eldor spectroscopy. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, (52) :147–148.

FLAENDER, M., COSTA G., NONGLATION G., SAINT-PIERRE C, CAILLAT S., DELAPIERRE G., AND GASPARUTTO, D. DNA Arrays based on Clickable and Lesion-containing Hairpin Probes to Detect Base Excision Repair Activities. (en cours)

FLAENDER, M., MAUREL, V., SICOLI, G., SAINT-PIERRE, C., GAMBARELLI, S., AND GASPARUTTO, D., Insertion of spin label into DNA by click chemistry : applications to detection of repair protein-DNA interactions. (en cours)

Nouvelles sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou paramagnétiques : applications à l'étude structurale des lésions de l'ADN et à leur réparation sur support.

L'ADN, support de l'information génétique, est constamment soumis à des stress l'endommageant. Ceci peut conduire à des modifications structurales de la molécule d'ADN et à des conséquences biologiques néfastes de type mutagenèse ou cancérogénèse. Les lésions de l'ADN peuvent être réparées par des complexes enzymatiques qui restaurent la séquence originale. Dans le présent travail nous nous sommes intéressés aux aspects structuraux des lésions de l'ADN et à leur réparation par excision de base (BER) ou par réversion (RR). Notre travail a consisté à développer un nouvel outil de type biopuce pour détecter ces activités de réparation par mesure de fluorescence. Pour cela des oligonucléotides lésés auto-complémentaires ont été immobilisés sur des lames de verre. Après avoir mis au point les conditions d'immobilisation, par la chimie click, nous avons validé ce nouveau biocapteur pour la détection d'activités de réparation d'enzymes purifiées (glycosylases et AP-endonucléases) ou au sein d'extraits cellulaires. Utilisant un principe similaire, nous avons adapté cette biopuce pour mesurer les activités de réparation par réversion ainsi que pour le screening d'inhibiteurs. Dans une seconde partie de ce travail, nous avons appliqué la technique de résonance paramagnétique électronique pulsée (RPE pulsée) pour étudier la déformation structurale induite par plusieurs dommages de l'ADN. Pour cela nous avons développé une méthode de multi-marquage de l'ADN par des radicaux nitroxydes. Cette technique a alors été appliquée pour la première fois à la détection d'une activité enzymatique de réparation de l'ADN.

Mots clefs : Lésions de l'ADN, oligonucléotides, réparation enzymatique, fluorescence, biopuce, RPE pulsée, chimie click.

New nucleic acid fluorescent or paramagnetic probes : applications to structural analyses of DNA damages and their repair on a solid support.

DNA which is the support of genetic information is constantly subjected to damaging agents. These processes can lead to structural modifications of the DNA molecule and harmful biological consequences, such as mutagenesis or cancer. DNA damages can be repaired by enzymatic complexes which restore the original sequence of the biopolymer. In this study we were interested in structural aspects of DNA lesions and in their repair by the base excision repair (BER) and the reversion repair (RR) pathways. The present work consisted in developing a new tool in a biochip format aim at detecting these repairs activities by fluorescence measurement. Thus, hairpin-shaped damaged oligonucleotides were grafted on glass slides by a click chemistry approach. After optimization of the immobilization conditions, by click chemistry, this new biosensor was validated for the detection of repair activities using purified enzymes (glycosylases and AP-endonucleases) and cell extracts. Using a similar approach, we adapted this microarray to measure reversion repair and to screen DNA repair inhibitors. In a second part of this work, we applied the pulsed electron paramagnetic resonance (pulsed EPR) technique to study structural deformation induced by several DNA damages. To achieve this goal we developed a multiple site-specific labelling procedure of the DNA probes by nitroxide radicals. Then, pulsed EPR was used for the first time to detect an enzymatic DNA repair activity.

Keywords : DNA damages, oligonucleotides, enzymatic repair, fluorescence, biochip, pulsed EPR, click chemistry.

